

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

ABSTRACT

European Patent No. 0 511 917 A1

Date of Publication: 4 NOV 92

Glycosylated prodrugs, procedure for their use with immuno-enzyme conjugates specific for tumors, and treatment of cancer. The formula of glycosylated anthracycline prodrug is shown in (I).



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : **0 511 917 A1**

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑳ Numéro de dépôt : 92401218.0

㉔ Date de dépôt : 29.04.92

㉑ Int. Cl.⁵ : C07H 15/252, C07F 7/18,
C07H 15/203, A61K 31/70,
C07H 15/26

㉓ Priorité : 30.04.91 FR 9105326

㉕ Date de publication de la demande :
04.11.92 Bulletin 92/45

㉗ Etats contractants désignés :
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE

㉙ Demandeur : LABORATOIRES HOECHST S.A.
TOUR ROUSSEL HOECHST, 1 Terrasse Bellini
F-92800 Puteaux (FR)

㉙ Demandeur : BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1 (DE)

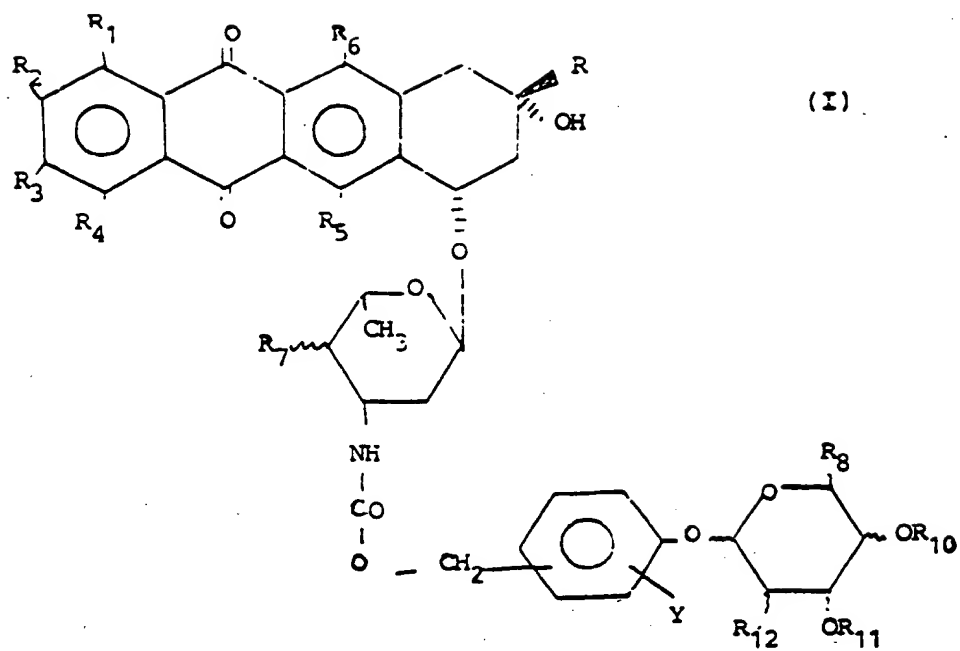
㉚ Inventeur : Jacquesy, Jean-Claude
46 rue du Planty
F-86180 Buxerolles (FR)
Inventeur : Gesson, Jean-Pierre
La Germonière, Montamisé
F-86360 Chasseneuil du Poitou (FR)
Inventeur : Monneret, Claude
9 rue Lamoricière
F-75012 Paris (FR)
Inventeur : Mondon, Martine
9 rue du Pontreau, Appt. 529
F-86000 Poitiers (FR)
Inventeur : Renoux, Brigitte
Liniers
F-86800 Saint Julien L'Ars (FR)
Inventeur : Florent, Jean-Claude
23 rue des Causses
F-91940 Les Ulis (FR)
Inventeur : Koch, Michel
116 Ellysée II
F-78170 La Celle Saint Cloud (FR)
Inventeur : Tillequin, François
70 rue de l'Amiral Mouchez
F-75014 Paris (FR)
Inventeur : Sedlacek, Hans Harald
Sonnenhang 3
W-3550 Marburg (DE)
Inventeur : Gerken, Manfred
Wankopf Strasse 12
W-3550 Marburg (DE)
Inventeur : Kolar, Cenek
Deutsch Hans Strasse 20
W-3550 Marburg (DE)
Inventeur : Gaudel, Gilbert
155 Boulevard Vincent Auriol
F-75013 Paris (FR)

㉜ Mandataire : Orès, Bernard et al
Cabinet ORES 6, Avenue de Messine
F-75008 Paris (FR)

EP 0 511 917 A1

㉝ Prodrogues glycosylées, leur procédé de préparation et leurs utilisations.

㉞ Prodrogues glycosylées, procédé pour leur préparation et leur utilisation avec des conjugués immuno-enzymatiques spécifiques de tumeurs, dans le traitement des cancers.
Ces prodrogues d'anthracyclines répondent à la formule I ci-après :



La présente invention est relative à des prodrogues glycosylées, à un procédé pour leur préparation et à leurs utilisations seules ou avec des conjugués immuno-enzymatiques spécifiques de tumeurs, dans le traitement des cancers.

De manière plus spécifique, la présente invention est relative à des prodrogues comprenant des anthracyclines modifiées qui peuvent être scindées notamment par l'action d'édits conjugués immuno-enzymatiques spécifiques de tumeurs, pour donner des substances cytotoxiques actives vis-à-vis des cellules tumorales.

La combinaison d'une prodrogue et de conjugués enzyme-anticorps monoclonaux, comme agents thérapeutiques, a été décrite dans la littérature. De manière générale, les anticorps impliqués, qui sont dirigés contre un tissu spécifique et qui sont liés de manière covalente à une enzyme ayant la capacité de scinder la prodrogue, sont d'abord injectés à un animal approprié, notamment l'homme, puis on administre ensuite une prodrogue qui peut être activée par l'enzyme. La prodrogue est convertie, par l'action du conjugué enzyme-anticorps, qui est ancré au niveau du tissu spécifique en cytotoxine, qui exerce un effet cytotoxique sur ledit tissu.

La Demande Internationale WO 81/01145, au nom de UNIVERSITY OF ILLINOIS FOUNDATION, décrit des prodrogues activables par des enzymes hydrolytiques et définit cinq critères pour une efficacité optimale d'une prodrogue : (1) il doit y avoir suffisamment d'enzyme activante au niveau de la tumeur, de façon à ce que des taux cytotoxiques d'agent antitumoral soient libérés au niveau de la tumeur, (2) la prodrogue ne doit pas être activée dans d'autres zones que celle de la tumeur, (3) la prodrogue doit être un substrat approprié de l'enzyme associée à la tumeur, dans des conditions physiologiques, (4) la prodrogue ne doit pas être toxique ou beaucoup moins toxique que l'agent antitumoral activé et (5) la substance activée doit avoir une demi-vie biologique courte de telle sorte que les effets toxiques soient limités à la tumeur.

Plus spécifiquement, il est précisé dans cette Demande, que des agents antitumoraux peuvent être rendus spécifiques vis-à-vis d'une tumeur par adjonction d'un peptide qui convertit ledit agent en une prodrogue pharmacologiquement inactive, mais sélectivement activable uniquement au niveau du site tumoral par une enzyme présente en quantités importantes au niveau de la tumeur (plasmine et activateur du plasminogène, notamment). La partie peptidique de la prodrogue présente une séquence en amino-acides telle qu'elle sera scindée enzymatiquement de la partie agent antitumoral, par des protéases telles que la plasmine ou l'activateur du plasminogène, de manière à libérer l'agent antitumoral, sous sa forme active dans la zone tumorale.

Les prodrogues activables par des enzymes hydrolytiques peuvent avoir une structure dans laquelle le peptide et la partie antitumorale sont liées de manière covalente par un intermédiaire d'un connecteur auto-immolable ayant une structure moléculaire telle que le clivage enzymatique du peptide/connecteur auto-immolable entraînera spontanément le clivage de sa liaison avec la partie antitumorale.

Cependant, les prodrogues décrites dans cette Demande internationale ne peuvent être utilisées que dans les cancers qui entraînent une production accrue d'enzymes et plus particulièrement de protéases, au niveau du site tumoral ; or, ces enzymes d'activation, aptes à cliver les prodrogues décrites dans cette Demande, ne se retrouvent pas en quantité suffisante dans les cancers humains, de sorte que ces prodrogues ne permettent pas d'obtenir la toxicité sélective recherchée (K.D. BAGSHAW, Br. J. Cancer, 1987, 56, 531).

La Demande Internationale WO 88/07378, au nom de CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LTD décrit un système thérapeutique qui contient d'une part un conjugué enzyme-anticorps et d'autre part un prodrogue qui peut être activée par l'enzyme. L'anticorps du conjugué enzyme anticorps reconnaît un antigène spécifique d'une tumeur et l'enzyme est apte à convertir la prodrogue en agent cytotoxique.

Cette Demande précise qu'il est préférable d'utiliser des enzymes autres que des enzymes de mammifères, de manière à prévenir une libération prématurée d'agent cytotoxique par des enzymes endogènes.

De manière plus spécifique, cette Demande décrit des moutardes à l'azote modifiées (telles que l'acid p-bis-N-(2-chloroéthyl)amino-benzylglutamique et ses dérivés), convertibles en moutardes à l'azote en présence de carboxypeptidases et des anthracyclines dont le groupe amino terminal est transformé en amide en présence d'un amino-acide.

Toutefois ces prodrogues présentent l'inconvénient majeur de conserver une cytotoxicité intrinsèque non négligeable.

La Demande européenne 302 473 décrit également un système thérapeutique qui contient deux composants et dans lequel le conjugué enzyme-anticorps situé sur le tissu tumoral, scinde une prodrogue en un composé actif cytotoxique. De manière plus spécifique, les conjugués enzyme-anticorps contiennent de la phosphatase alcaline (PA), de la pénicilline V amidase (PVA) ou de la cytosine désaminase (CD) et sont utilisés en association respectivement avec du 4'-phosphate étoposide et ses dérivés (ou de la 7-(2-aminoéthyl phosphate) mitomycine), avec de la N-(p-hydroxyphénoxycétyl)adriamycine ou de la 5-fluorocytosine comme prodrogue.

Le système décrit dans cette Demande présente toutefois l'inconvénient d'utiliser soit une enzyme circulante, la phosphatase alcaline, susceptible d'activer précocément la prodrogue au niveau circulatoire, soit une enzyme exogène (PVA ou CD), susceptible d'entraîner des phénomènes d'intolérance ou de sensibilisation.

La Demande Internationale WO 90/07929, au nom de AKZO NV décrit une méthode d'activation *in vivo*, spécifique de site, d'une prodrogue, chez un animal, en utilisant un conjugué activateur-substance spécifique vis-à-vis de la cible, dont la partie activateur permet la conversion de la prodrogue en substance pharmacologiquement active. L'activateur est notamment une enzyme, tel que le lysozyme, d'origine humaine, qui n'est pas présente dans la circulation ou alors en très petites quantités et dont les substrats naturels sont également absents de la circulation ou de la surface des cellules non-cibles. La substance spécifique vis-à-vis de la cible est notamment un anticorps dirigé contre un antigène spécifique de tumeur. La prodrogue peut notamment comprendre une anthracycline (doxorubicine, par exemple) modifiée par un oligomère de chitine lié à l'anthracycline par un groupe amino au niveau du carbonyle C₁₃ sur l'anthracycline ou sur la partie glycosylée.

Toutefois, le système proposé dans cette Demande internationale présente notamment l'inconvénient majeur de ne pas libérer la doxorubicine elle-même, mais un dérivé de celle-ci, Dox-(GlcNAc)₁ ou Dox-(GlcNAc)₅ ; il ne s'agit donc pas, d'une part, d'une prodrogue au sens strict, et d'autre part, on ne dispose, en ce qui concerne ces dérivés, de recul suffisant tant du point de vue pharmacologique que du point de vue toxicologique.

Il ressort de ce qui précède que les principaux inconvénients des systèmes antérieurs sont :

1) en ce qui concerne le choix de l'enzyme

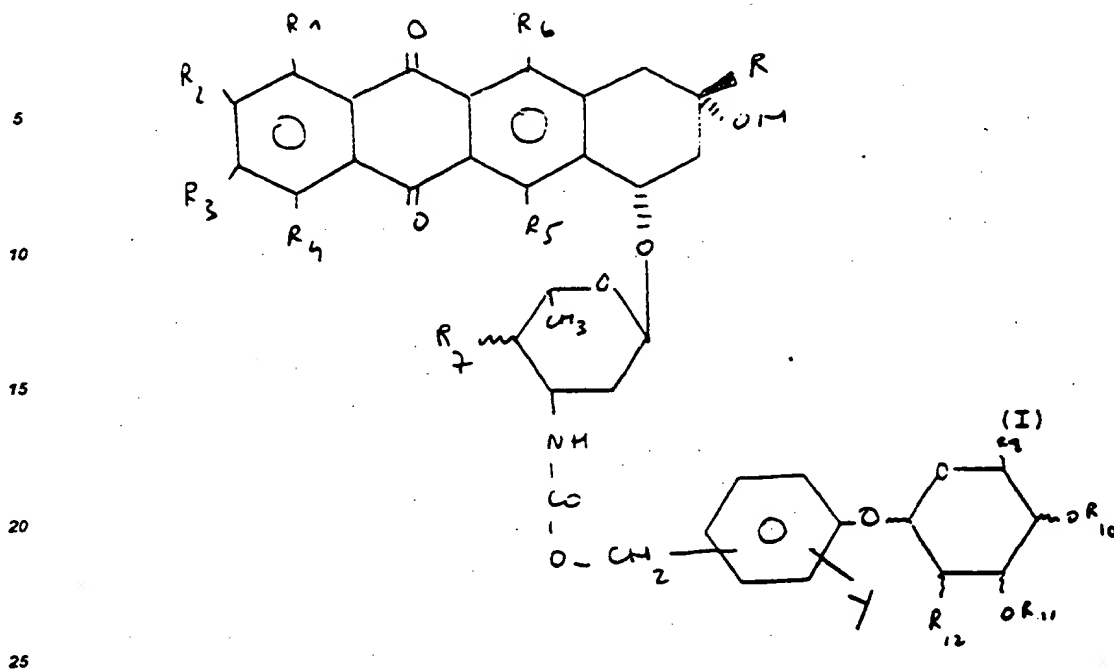
- le clivage non désiré de la prodrogue (enzyme circulante) ;
- le clivage de la prodrogue lié à la production d'une enzyme en quantité importante au niveau du site tumoral ;
- l'utilisation d'enzymes exogènes susceptibles d'entraîner des phénomènes d'intolérance ou de sensibilisation ;

2) en ce qui concerne le choix de la prodrogue :

- la cytotoxicité intrinsèque de la prodrogue ;
- la production d'un dérivé d'anthracycline dont les effets pharmacologiques et toxiques ne sont pas suffisamment connus ;
- l'utilisation d'une prodrogue à deux compartiments (substrat de l'enzyme + agent cytotoxique), qui a l'inconvénient d'entraîner des interférences stériques ou électroniques avec la réaction de clivage enzymatique.

La Demanderesse s'est en conséquence donné pour but de fournir des prodrogues aptes à être transformées en substances pharmacologiquement actives notamment en présence d'un conjugué enzymatique approprié, qui répondent mieux aux besoins de la pratique que les prodrogues de l'Art antérieur, notamment en ce qu'elles sont stables, en ce qu'elles n'entraînent pas d'interférences stériques ou électroniques, lors de la réaction de clivage enzymatique et en ce qu'elles fournissent au site tumoral uniquement, la substance cytotoxique active.

La présente invention a pour objet des prodrogues d'anthracyclines, caractérisées en ce qu'elles répondent à la formule I ci-après :



dans laquelle,

R_1 , R_2 , R_3 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ;

R_4 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle ou un groupe méthoxy ;

R représente un groupe $CO-CH_2-R''$, dans lequel R'' est un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C_1-C_6 , un groupe hydroxyle, un groupe alkoyle, un groupe O-acyle ou un groupe aryle ;

R_5 et R_6 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ;

R_7 représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ;

R_8 représente un groupe $-CH_2-OR_9$ ou un groupe $COOR_9$ avec R_9 étant un alkyle en C_1-C_3 ou un atome d'hydrogène ;

R_{10} et R_{11} représentent un atome d'hydrogène, un groupement acyle protecteur ou un groupe alkyle ;

R_{12} représente un groupe hydroxyle, un groupement amine, un groupement amide ou un groupement O-acyle protecteur ;

le $-CH_2$ benzylique est de préférence en position para ou ortho de l'oxygène glycosylé ;

Y représente un atome d'hydrogène ou au moins un groupement électro-attracteur notamment choisi dans le groupe qui comprend le groupement NO_2 , un atome d'halogène, un groupement SO_2X , (avec $X = -CH_3, C_6H_4-CH_3, NH_2, N-(alkyle_{C1-C4})_2, NH-(alkyle_{C1-C4}), -CN$, acyle ou $COO-alkyle$, et/ou au moins un groupement électrodonneur choisi dans le groupe qui comprend les groupements de type O-alkyle, $NHCO-alkyle$, $N(alkyle)CO-alkyle$, S-alkyle, alkyle.

On entend, au sens de la présente invention, par groupements acyle et alkyle des groupements comprenant de 1 à 5 atomes de carbone.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lorsque Y représente un/des groupements électro-attracteurs, ceux-ci sont de préférence en position ortho et/ou para de l'oxygène glycosylé et lorsque Y représente un/des groupements électrodonneurs, ceux-ci sont de préférence en position méta.

Conformément à l'invention :

lorsque le CH_2 benzylique est en position ortho par rapport audit oxygène glycosylé, Y est en position para et représente un atome d'hydrogène ou un groupement électro-attracteur et/ou en position méta et représente un atome d'hydrogène ou un groupement électrodonneur,

lorsque le CH_2 benzylique est en position para, Y est en position ortho et représente un atome d'hydrogène ou un groupement électro-attracteur et/ou en position méta et représente un atome d'hydrogène ou un groupement électrodonneur.

On obtient ainsi des dérivés para ou ortho-hydroxy benzyl carbamates d'anthracyclines, dont la fonction

phénol est masquée et qui, de manière surprenante, peuvent être scindés en anthracycline cytotoxique active pharmacologiquement et en ose, aussi bien par une glycosidase que par un conjugué glycosidase-ligand spécifique d'une tumeur.

Les composés de formule I conformes à l'invention englobent leurs différents isomères.

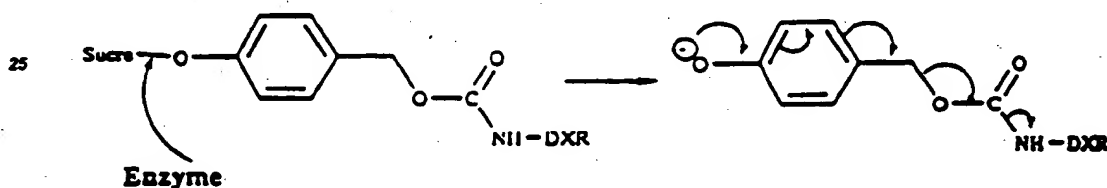
Les prodrogues d'anthracyclines conformes à l'invention, à 3 compartiments, c'est-à-dire comprenant une anthracycline, un bras autoimmolable (para ou ortho hydroxybenzylcarbamates) et un substrat enzymatique (ose) présentent les avantages suivants :

- elles préviennent les risques de non reconnaissance enzyme/substrat,
- elles évitent les problèmes d'interférences stériques ou électroniques, lors de la réaction de clivage enzymatique,
- la connection groupement amine du sucre-liaison O-hétérosidique, permet à la fois l'attaque enzymatique et fournit un encombrement suffisant de la molécule pour diminuer significativement la cytotoxicité de la prodrogue.

De manière avantageuse, le bras intermédiaire est de préférence, comme précisé ci-dessus, un para ou ortho hydroxybenzylcarbamate et la libération de l'anthracycline active à partir de la prodrogue à 3 compartiments est déterminée par deux processus :

- (1) la vitesse de l'hydrolyse enzymatique,
- (2) la vitesse de coupure du bras auto-immolable, qui sont en fait liés, dans la mesure où le bras auto-immolable joue un rôle important à la fois sur la vitesse de l'hydrolyse enzymatique et sur sa vitesse de coupure,

conformément au schéma A ci-après.



SCHEMA A

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les composés préférés de formule I comprennent notamment les radicaux suivants :

R_1, R_2, R_3 sont des atomes d'hydrogène,

R_4 est un groupe méthoxy,

R_5 et R_6 sont des groupes hydroxyles,

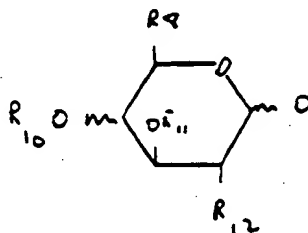
R est un groupe $-CO-CH_3$ ou un groupe $-CO-CH_2OH$,

R_7 est un atome d'hydrogène, ou un groupe hydroxyle,

R_8 est un groupe $-CH_2-OAc$, $-CH_2OH$, $-COOMe$, ou $-COOH$,

R_{10} et R_{11} qui peuvent être identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène ou un groupement Ac ,

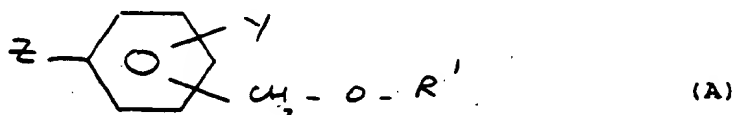
R_{12} représente un groupe hydroxyle ou un groupe OAc , lesquels radicaux R_8, R_{10}, R_{11} et R_{12} ont de préférence les positions suivantes :



Y est un atome d'hydrogène, un groupe NO₂ ou un atome de chlore, en para ou en ortho de l'oxygène glycosylé, et/ou un groupe OCH₃ en méta de l'oxygène glycosylé.

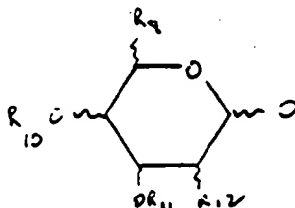
La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un composé de formule I qui peut notamment être dégradé par une glycosidase, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) le couplage, en présence, éventuellement, d'un promoteur approprié, d'un dérivé de formule A :



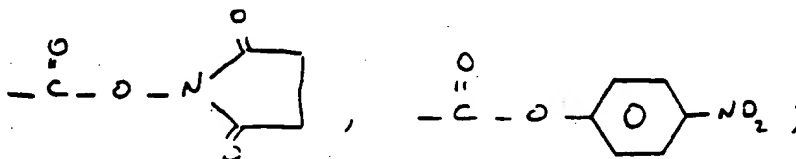
dans laquelle

Z représente un groupe hydroxyle, un groupe O-trialkylsilyle ou un groupe



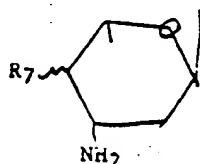
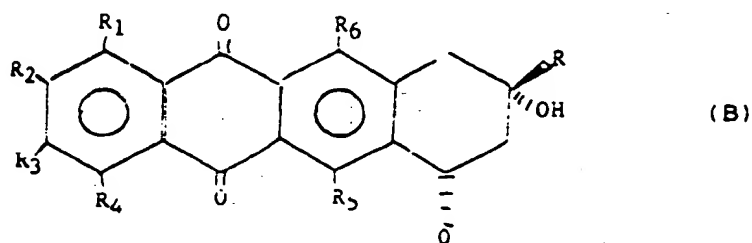
dans lequel R₉, R₁₀, R₁₁ et R₁₂ ont la même signification que ci-dessus ;

R' représente un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants :



le -CH₂ benzylique est de préférence en position para ou ortho de la fonction phénol, éventuellement modifiée (glycosylée ou silylée) ;

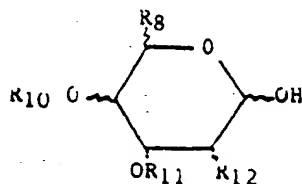
Y représente un atome d'hydrogène, ou au moins un groupement électro-attracteur notamment choisi dans le groupe qui comprend le groupement NO₂, un atome d'halogène, un groupement SO₂X, (avec X = -CH₃, C₆H₄-CH₃, NH₂, N-(alkyle_{C1-C4})₂, NH-(alkyle_{C1-C4}), -CN, acyle ou COO-alkyle, et/ou au moins un groupement électrodonneur choisi dans le groupe qui comprend les groupements de type O-alkyle, NH-CO-alkyle, N(alkyl)CO-alkyle, S-alkyle, alkyle avec une anthracycline de formule B.



20 dans laquelle R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ et R ont la même signification que ci-dessus,

(2) l'élimination des groupes protecteurs présents dans les composés obtenus, notamment par hydrolyse, transestérification ou saponification, et

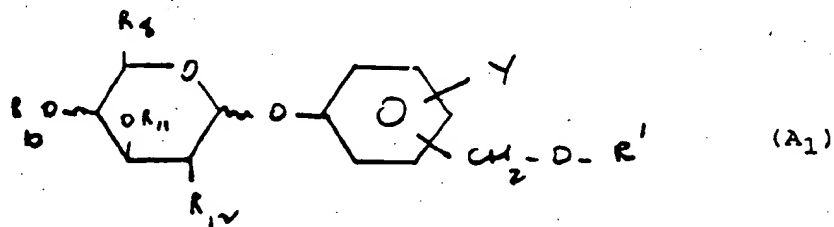
(3) éventuellement la condensation appropriée avec un ose de formule suivante :



35 dans le cas où Z représente un groupement hydroxyle ou un groupe O-trialkylsilyle, pour donner une prodrogue d'anthracycline de formule I, dans laquelle tous les radicaux R₁ à R₁₂ et R ont la même signification que précédemment.

Lorsque Z est un groupe O-trialkylsilyle, il est, préalablement à la condensation avec un ose, avantageusement désilylé par du fluorure de tétrabutyl ammonium, par exemple.

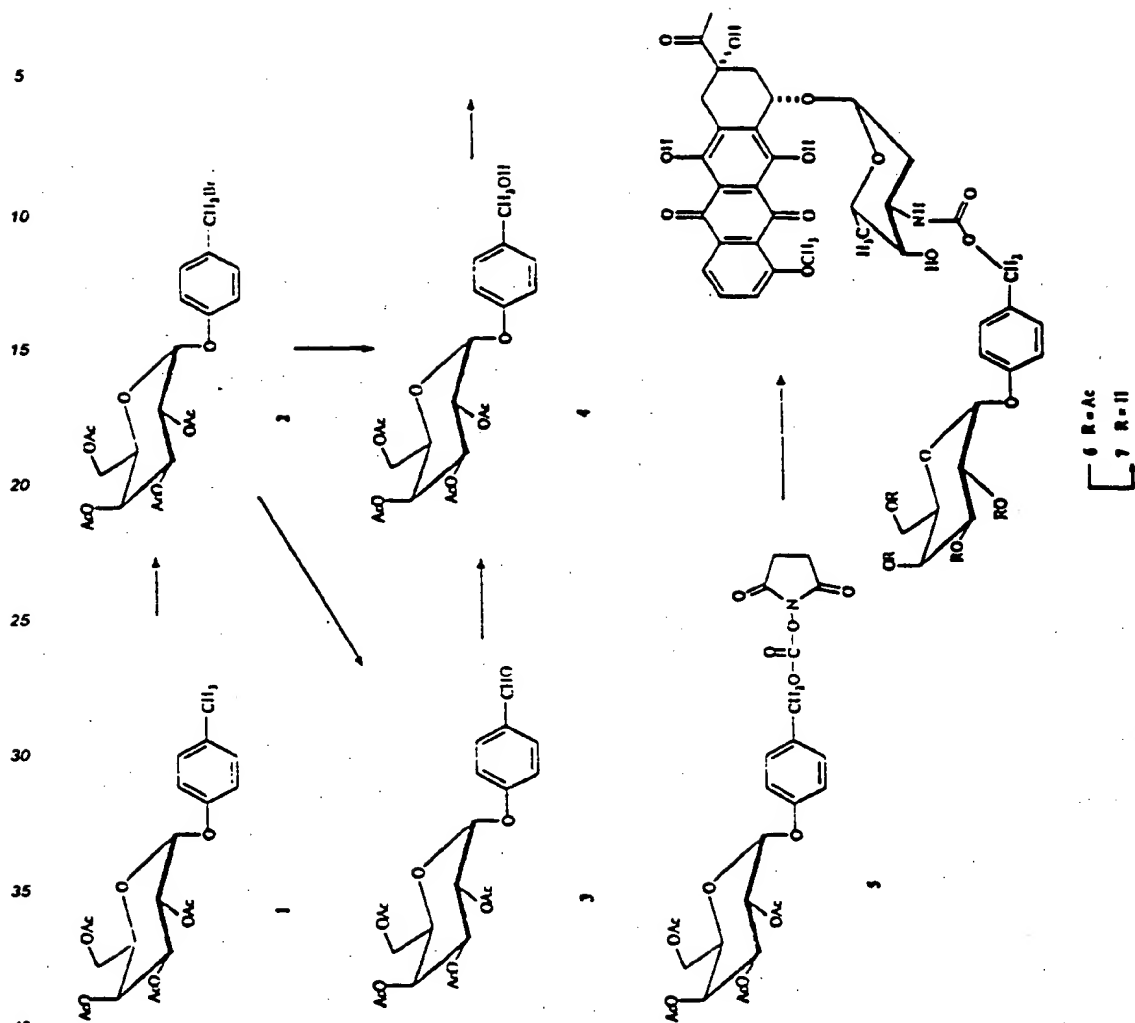
40 Selon un mode de réalisation avantageux dudit procédé, le composé de formule A est un dérivé hydroxy benzyle glycosylé de formule A₁ :



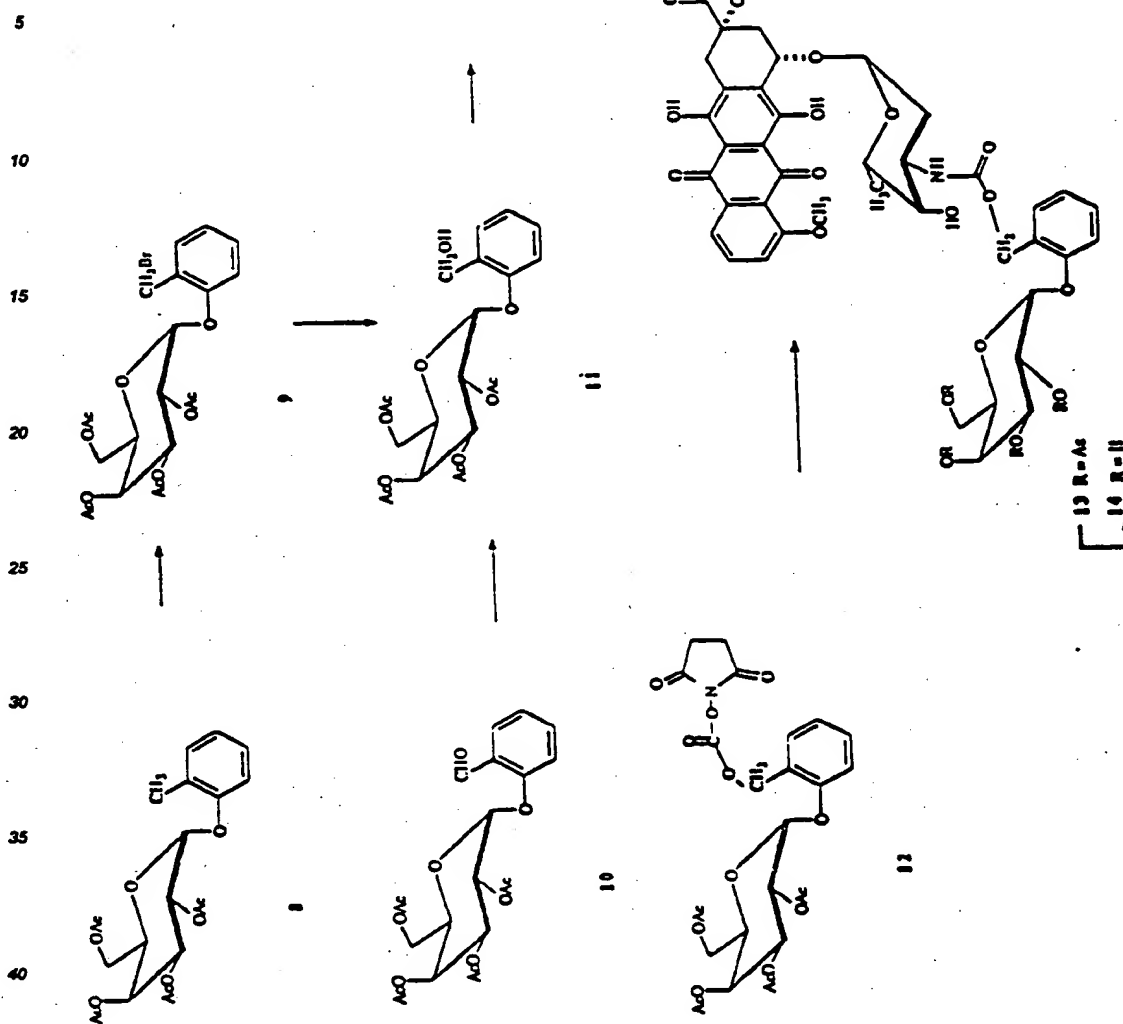
55 dans laquelle R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R' et Y ont la même signification que ci-dessus,

pour fournir, après couplage avec une anthracycline de formule B, une prodrogue d'anthracycline de formule I, telle que définie ci-dessus,

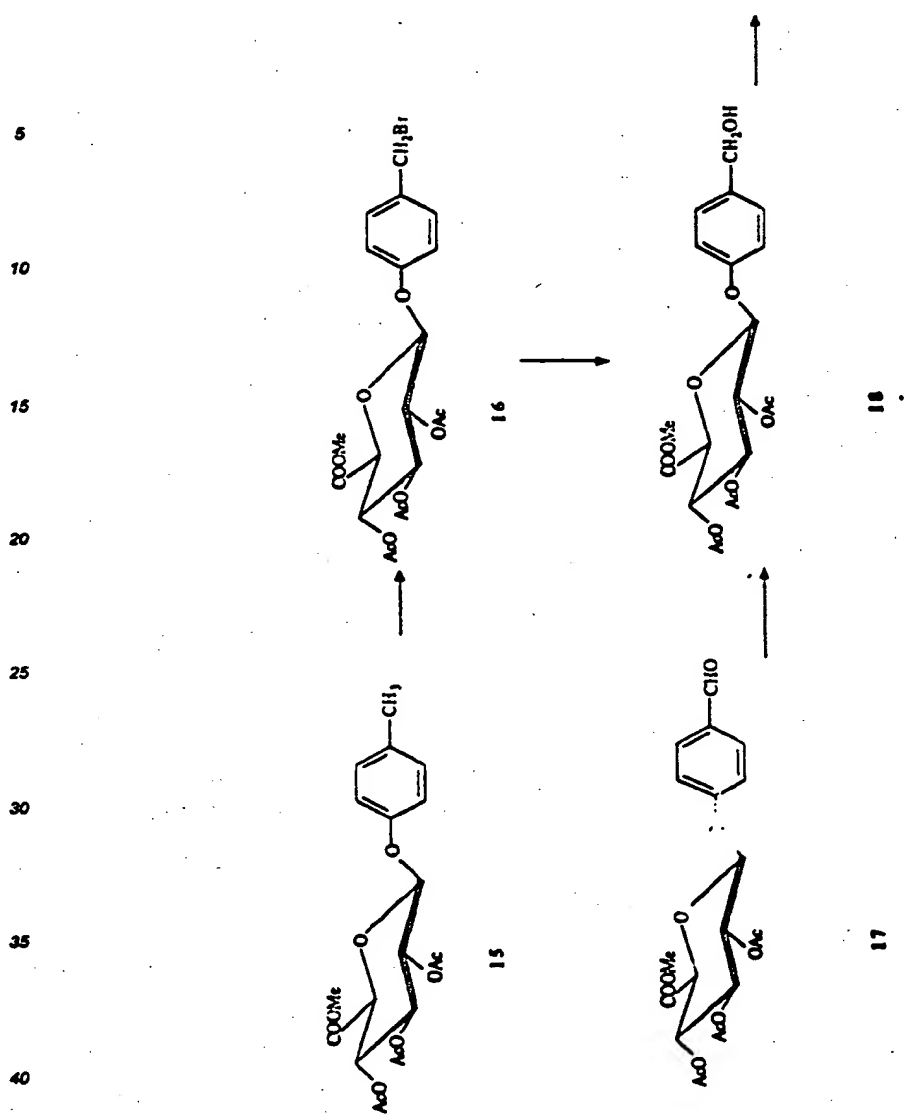
conformément aux schémas I, II, III, IV, VI, X, XI, XIV, XV et XVI ci-après.



SCHEMA I



SCHEMA II



SCHEMA III

5

10

15

20

25

30

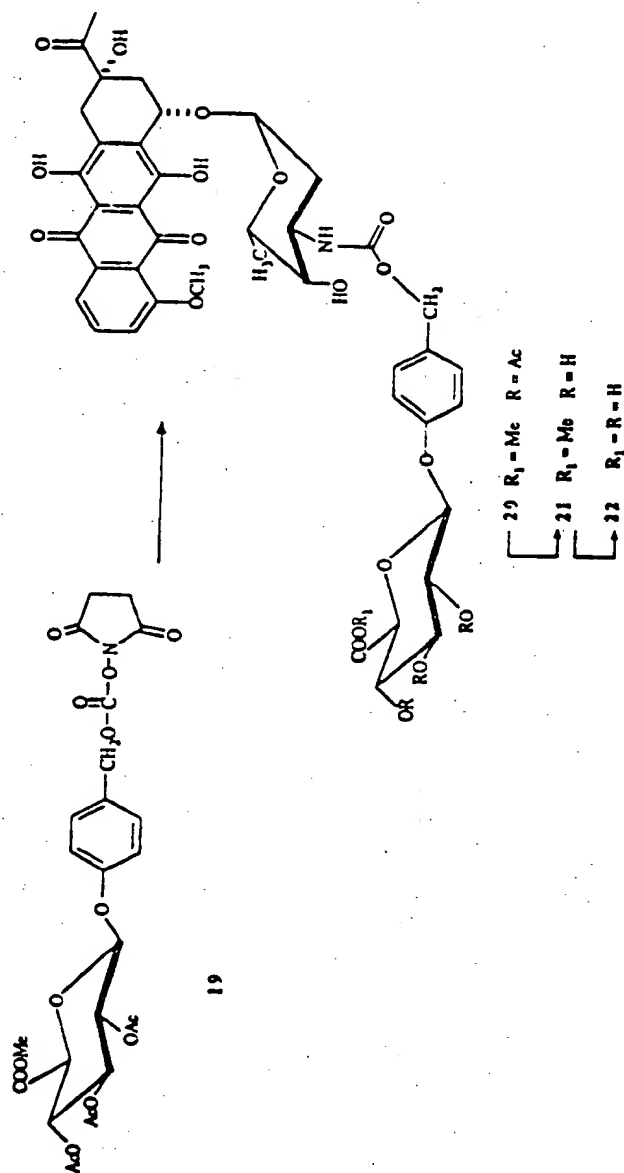
35

40

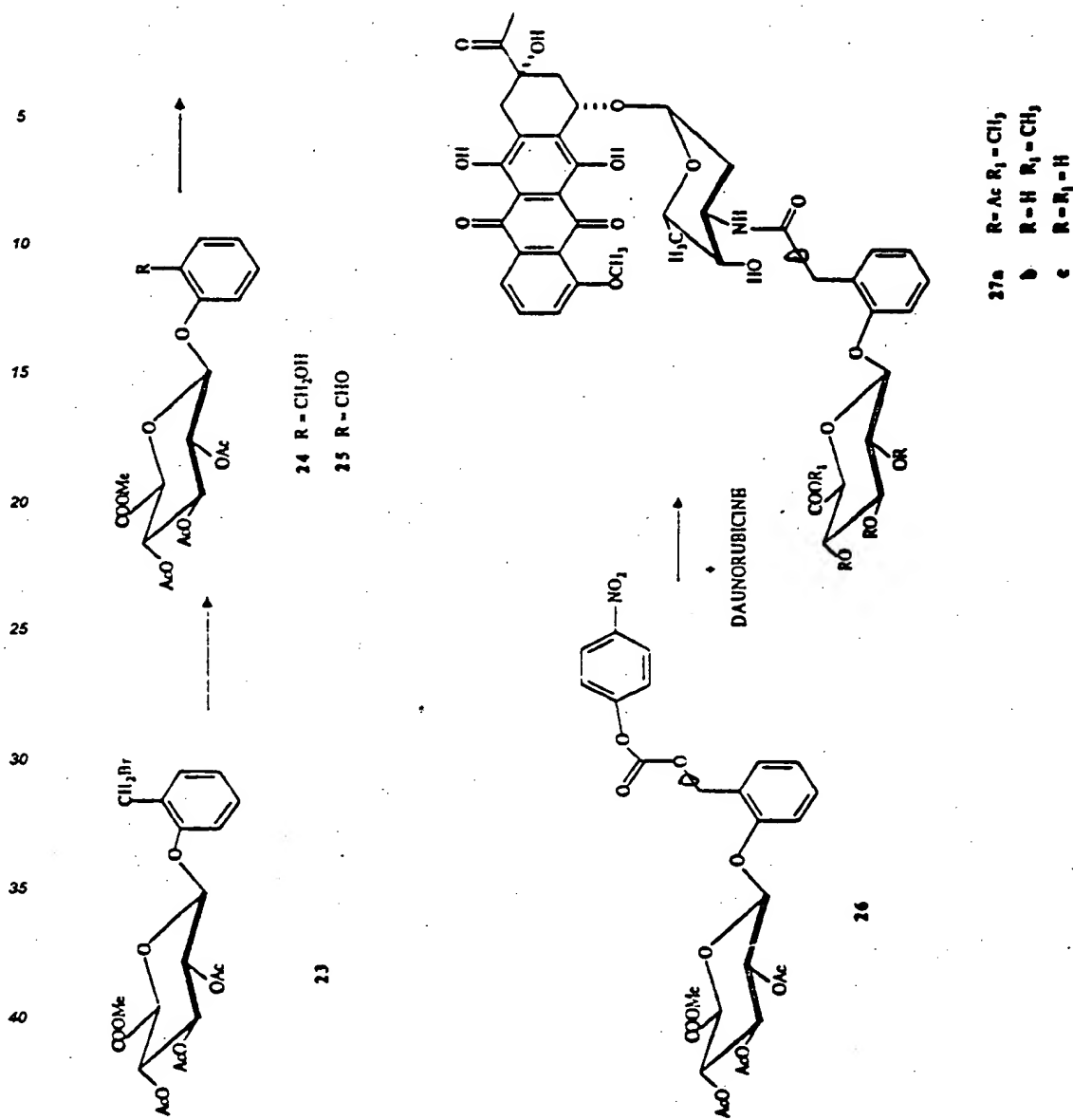
45

50

55

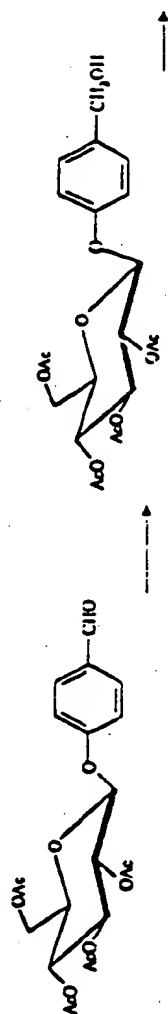


SCHEMA III (suite)

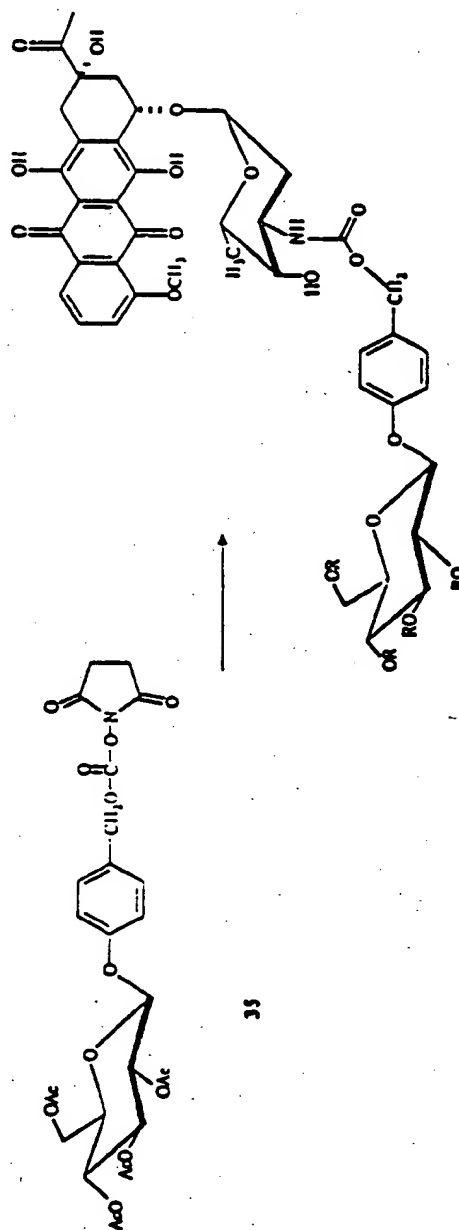


SCHEMA IV

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

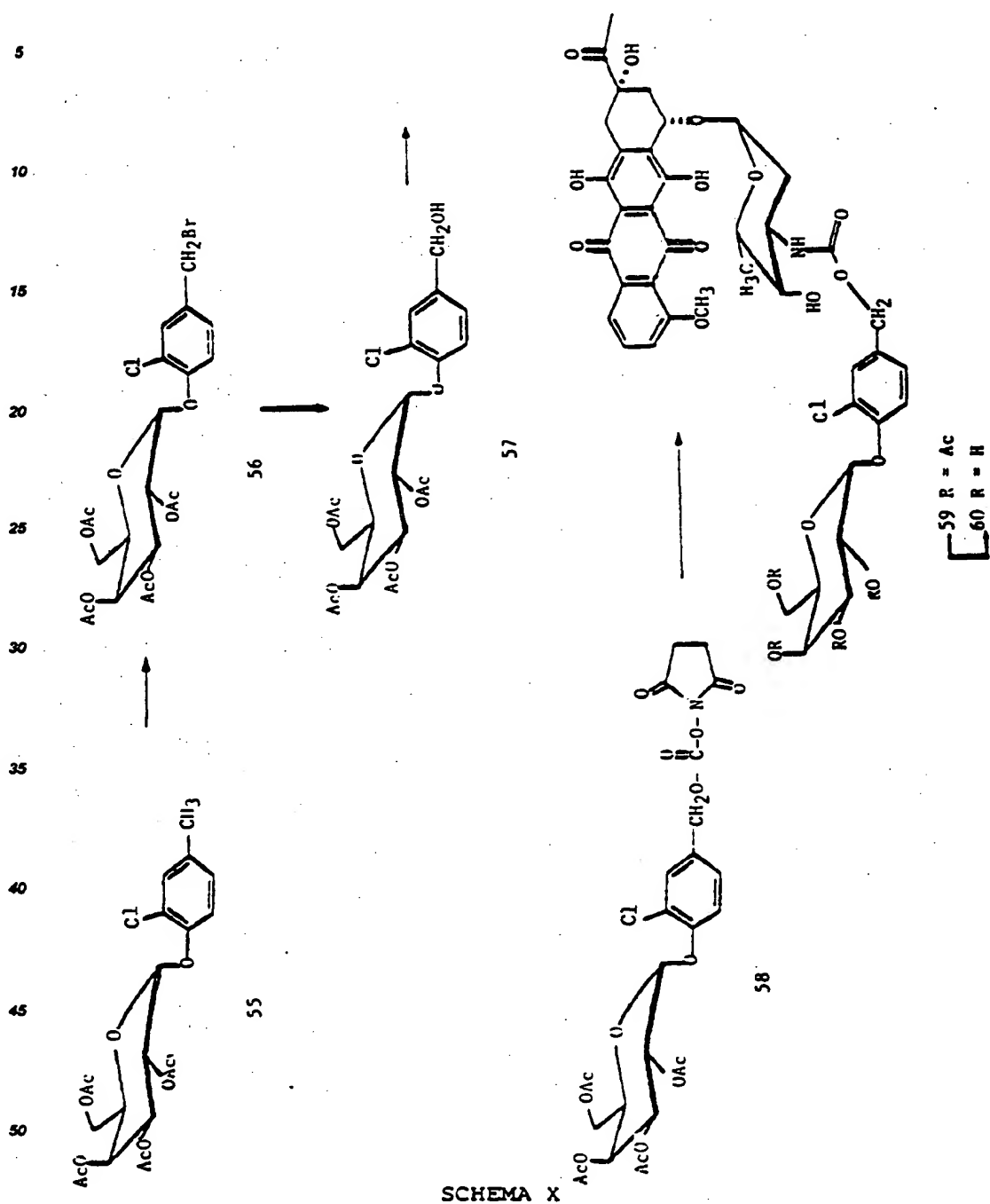


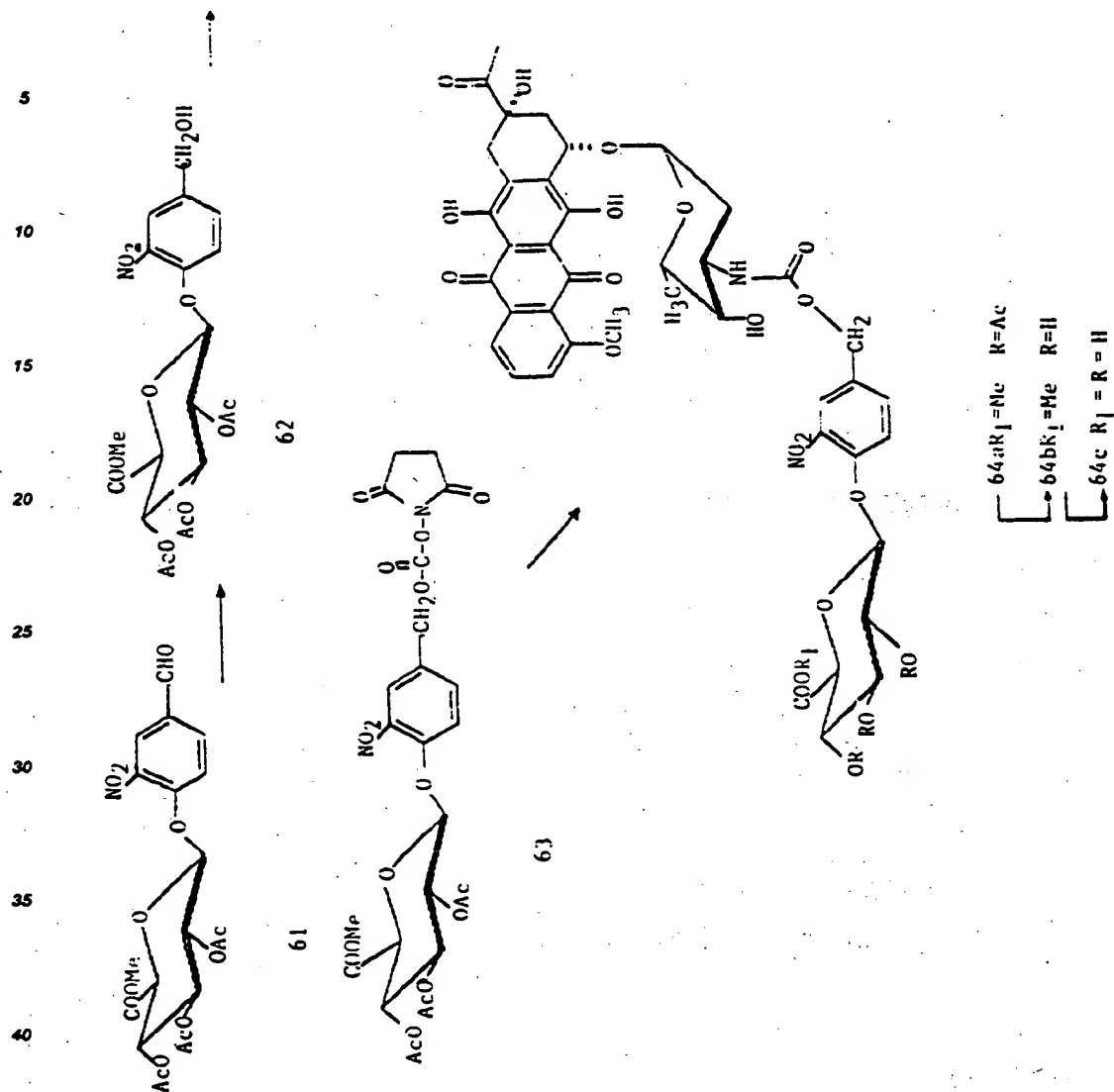
33 34



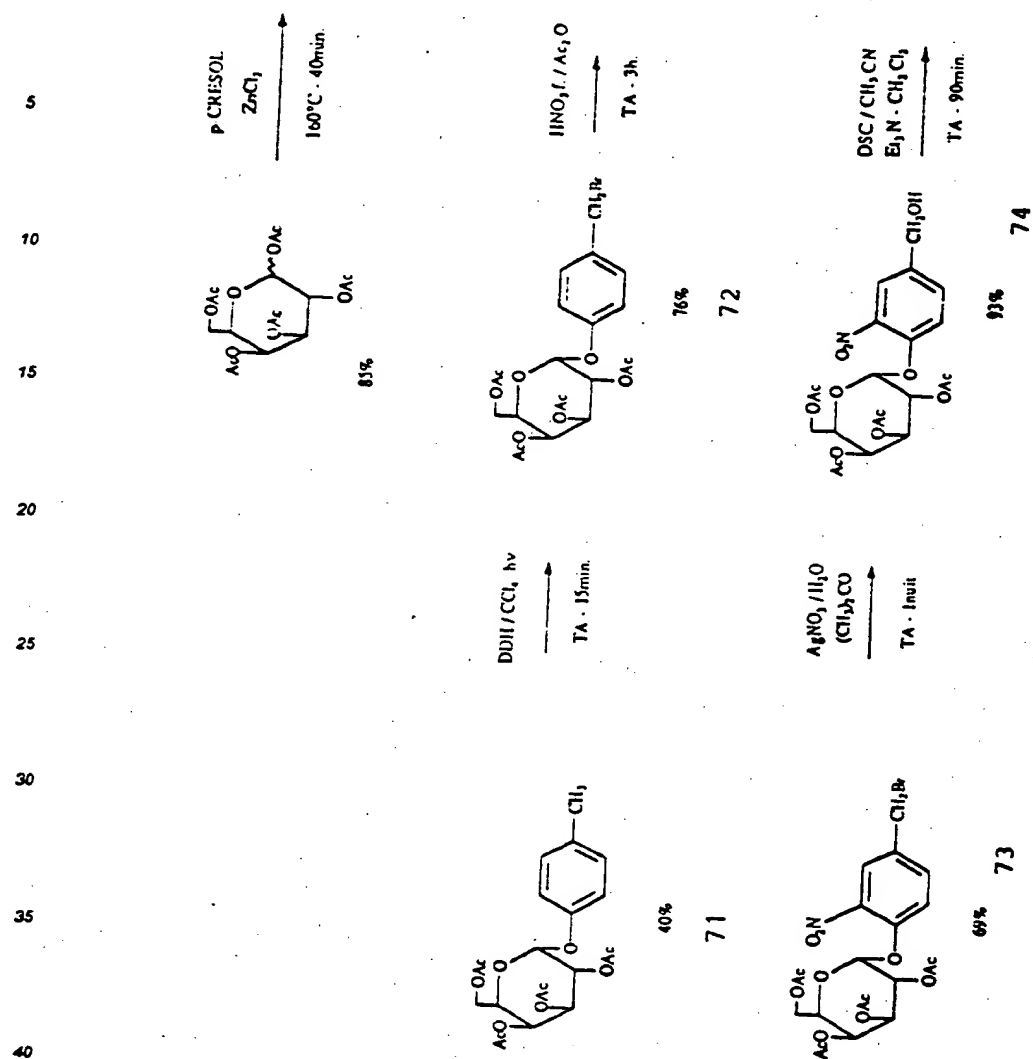
36 R = Ac
37 R = H

SCHEMA VI

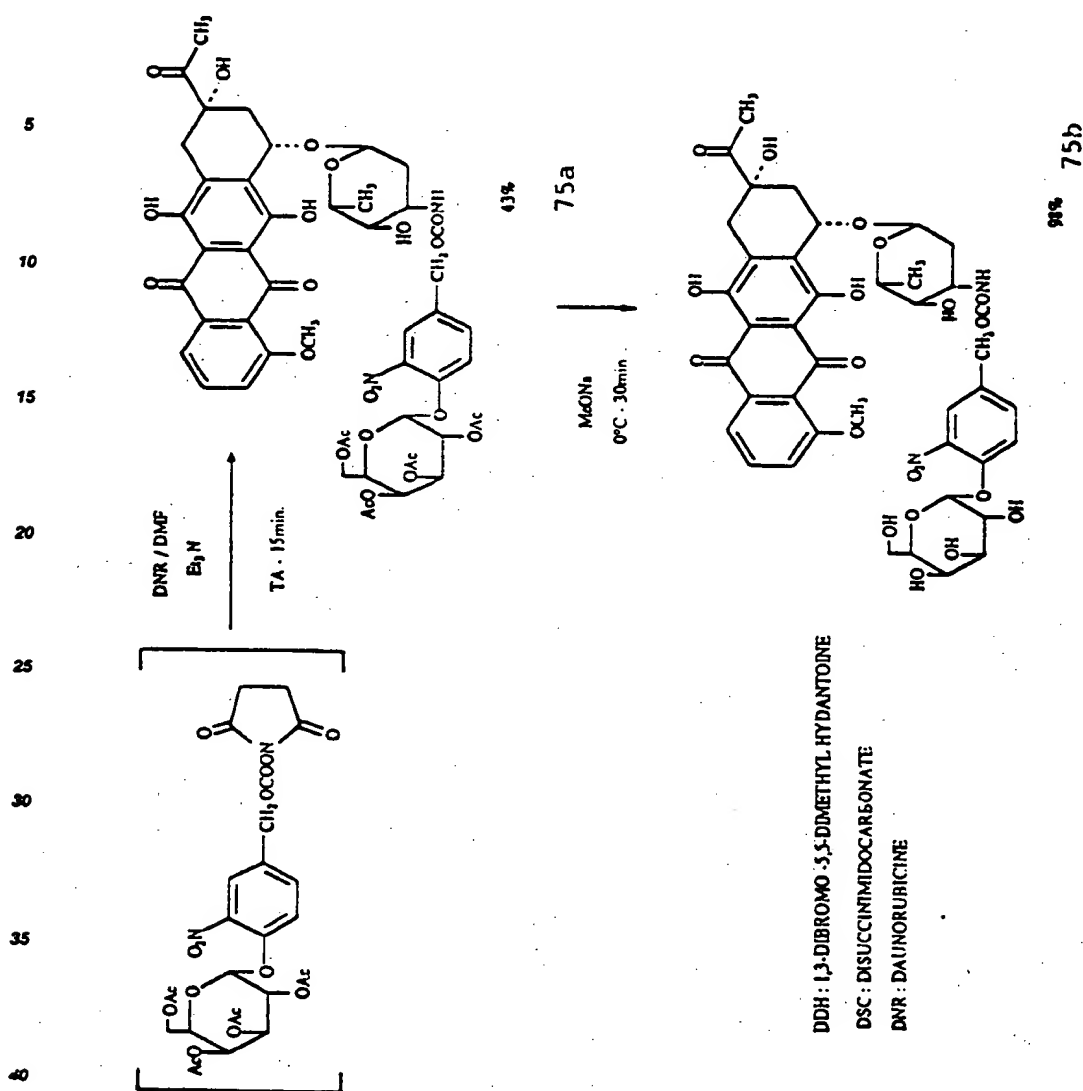




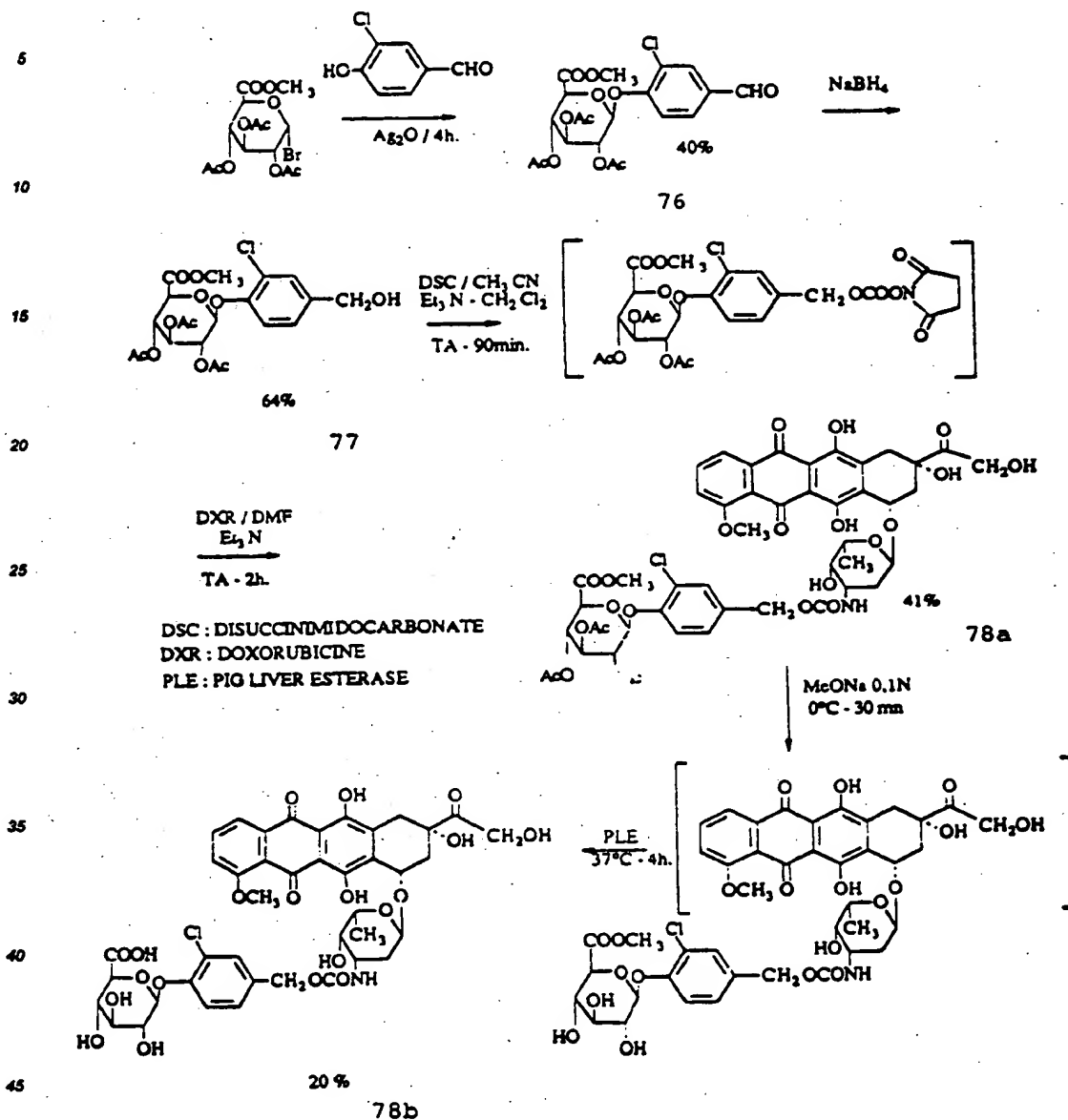
SCHEMA XI



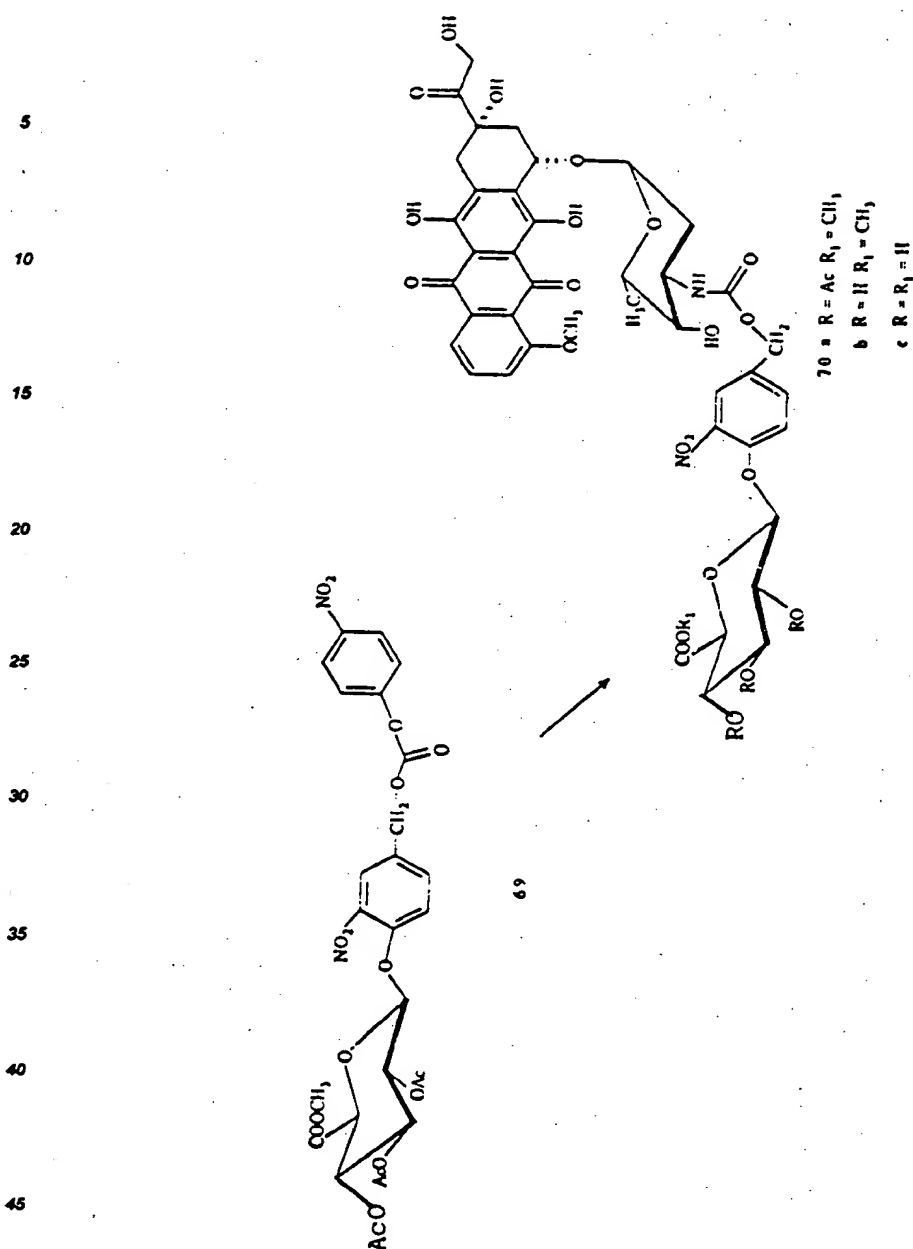
SCHEMA XIV



SCHEMA XIV (suite)



SCHEMA XV



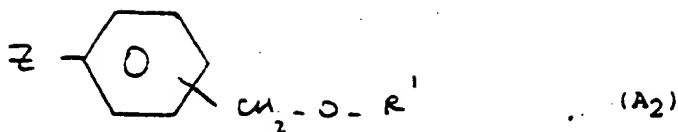
SCHEMA XVI

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, préalablement à l'étape (1), le dérivé p-hydroxybenzyle glycosylé est obtenu par :

- (a) fusion d'un crésol avec un ose ou un glucuronate de méthyle peracétylé,
- (b) bromation benzylique du produit obtenu,
- (c) solvolysé du dérivé bromé, et
- (d) activation du groupe hydroxyle par un dérivé hydroxysuccinimidyle ou paranitrophénoxy-carbonyle.

S'il n'un autre mode de réalisation dudit procédé, le composé de formule A est un dérivé silylé de formui

A₂ :



10 dans laquelle R' a la même signification que ci-dessus et Z représente un groupe O-diméthylhexylsilyle ou un groupe O-tertiobutyldiméthylsilyle pour fournir, après couplage avec une anthracycline de formule B, et condensation avec un ose convenable, une prodrogue d'anthracycline de formule I, telle que définie ci-dessus, conformément aux schémas V et VII, qui décrivent le procédé d'obtention des dérivés silylés, avant leur

15

20

25

30

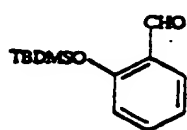
35

40

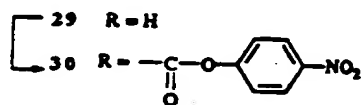
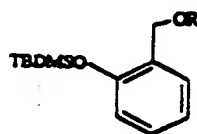
45

50

55



28

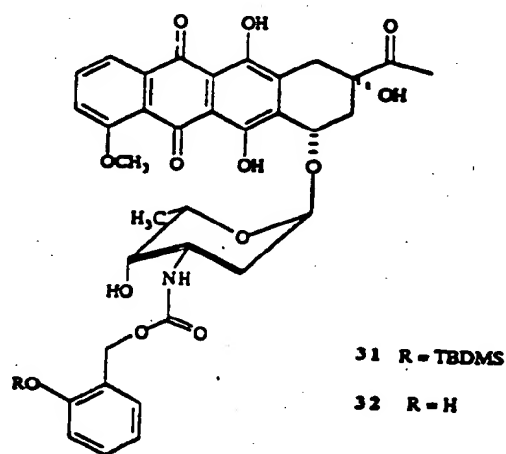


15

20

25

DAUNORUBICINE



35

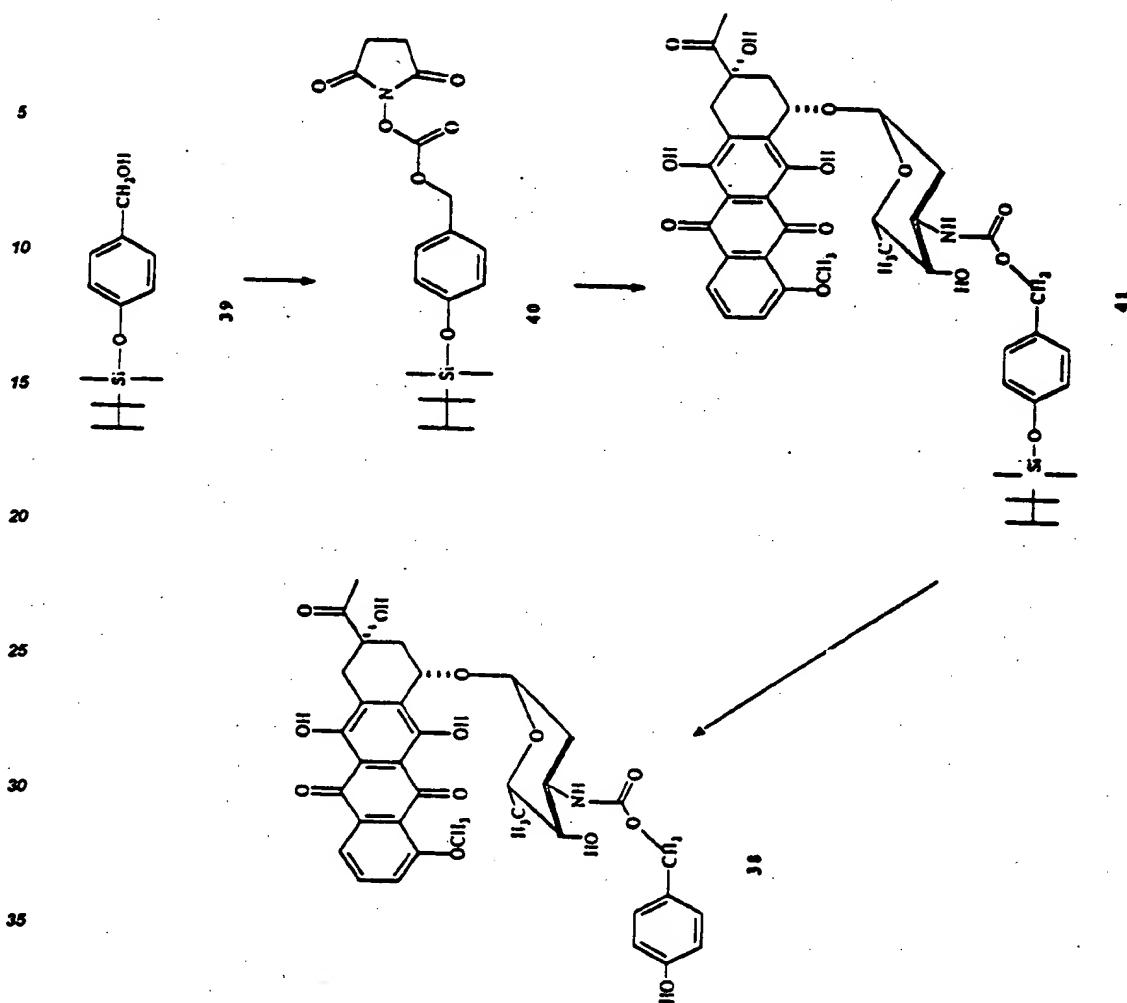
40

45

50

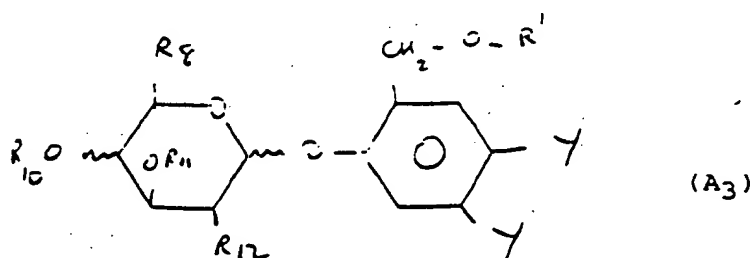
55

SCHEMA V



SCHEMA VII

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, le composé de formule A est un dérivé de orthohydroxybenzyle glycosylé de formule A₃ :



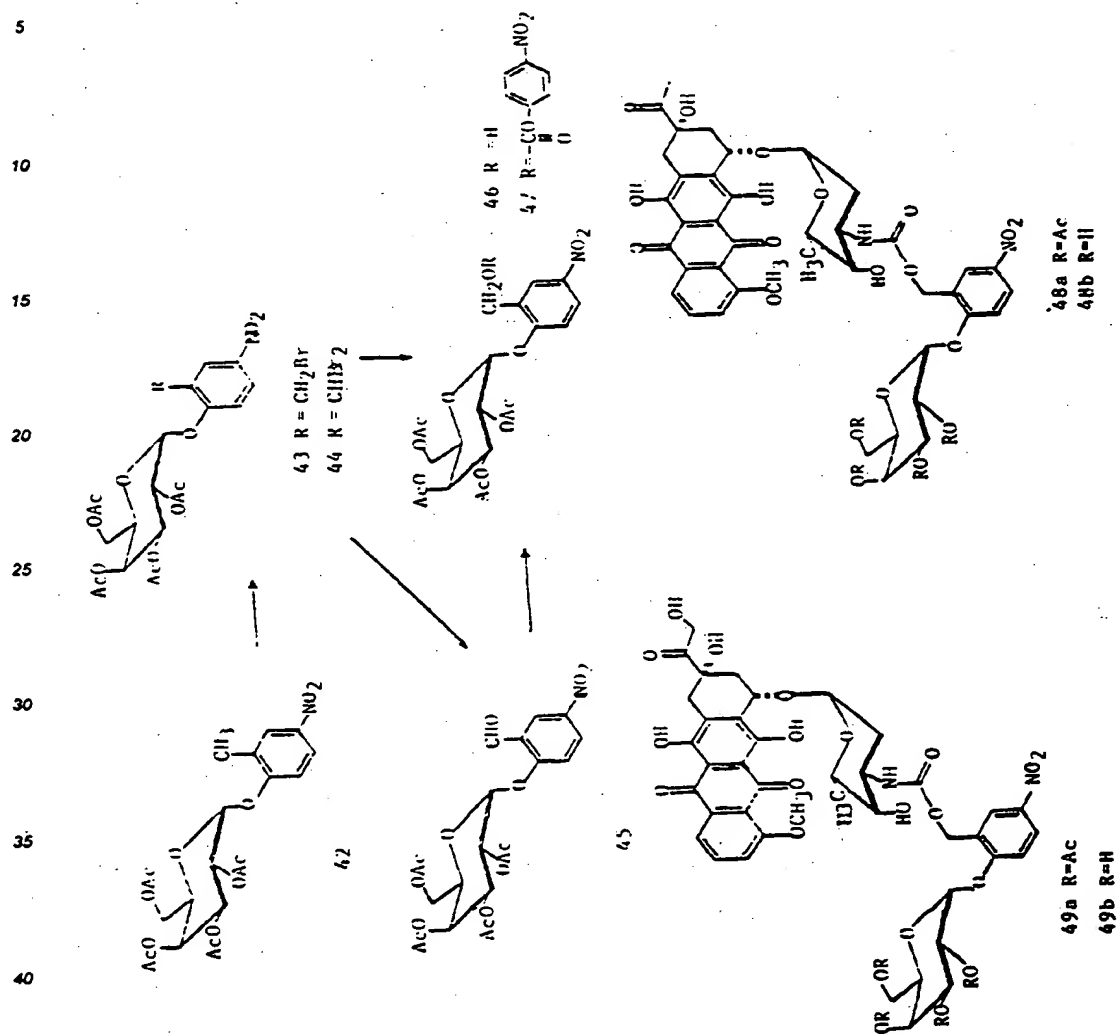
dans laquelle

R_8 , R_{10} , R_{11} , R_{12} et R' ont la même signification que ci-dessus,

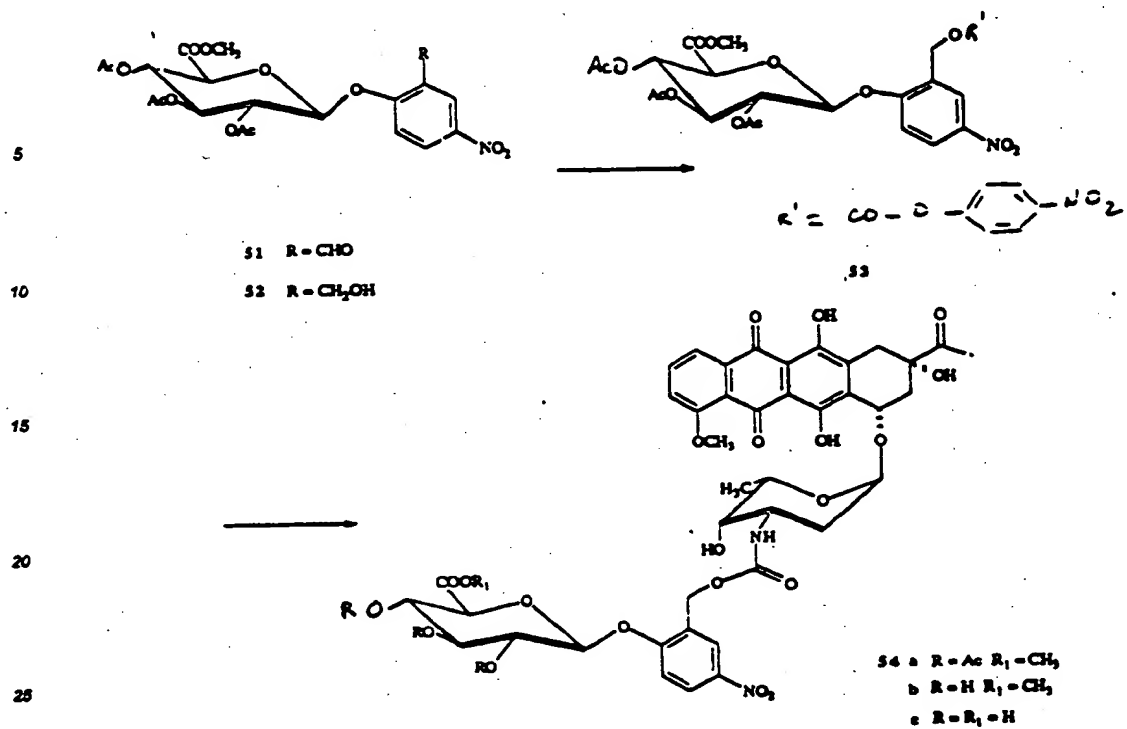
et Y est en position para et représente un groupe NO_2 ou un atome d'halogène et en position méta et représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthoxy ;

pour fournir, après couplage avec une anthracycline de formule B, une prodrogue d'anthracycline de formule I, telle que définie ci-dessus, dans laquelle :

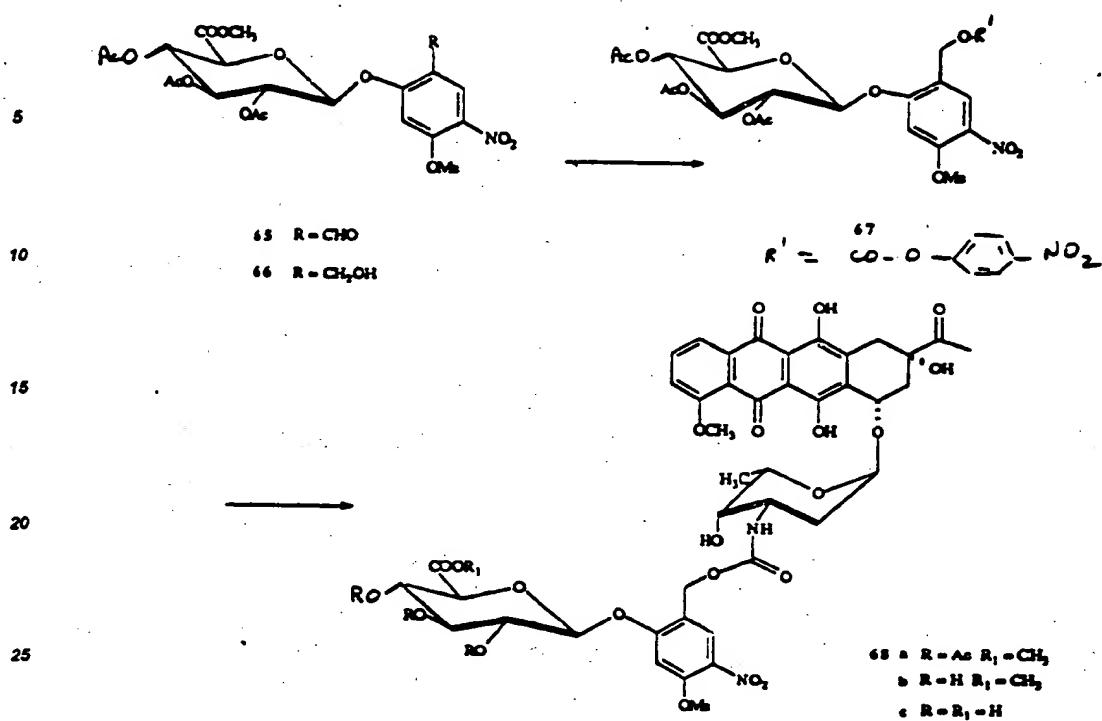
le CH_2 benzylique est en position ortho par rapport à l'oxygène glycosylé ;
conformément aux schémas VIII, IX, XII ou XIII ci-après.



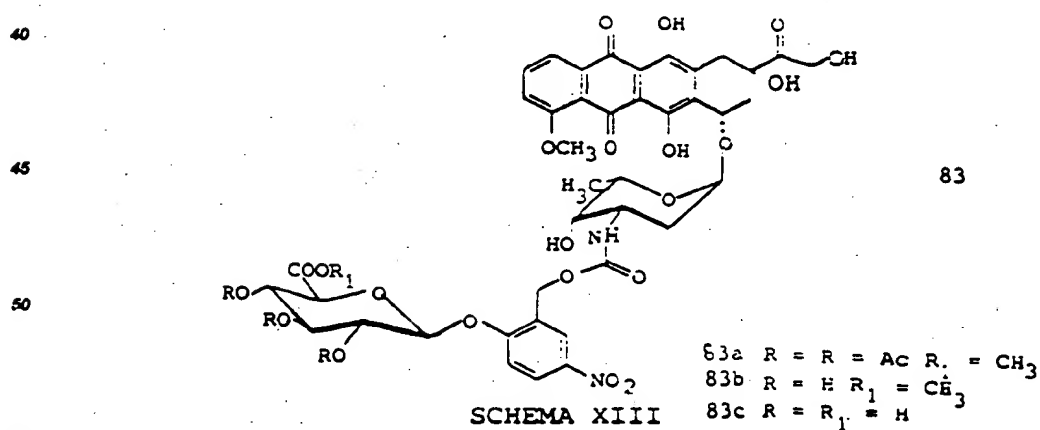
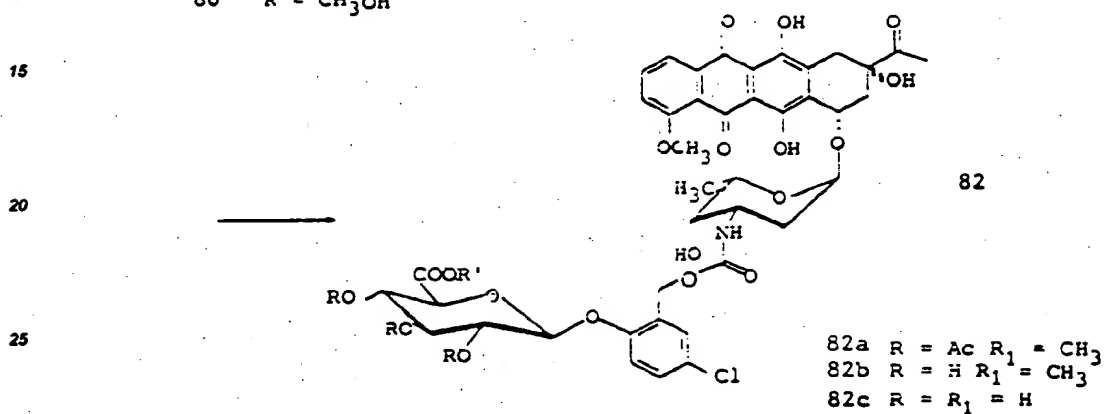
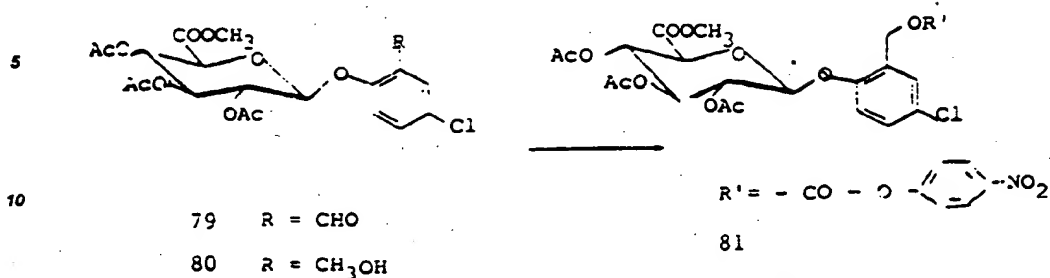
SCHEMA VIII



SCHEMA IX



SCHEMA XII



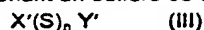
La présente invention a également pour objet des produits comprenant une prodrogue d'anthracycline

conforme à l'invention et un conjugué enzyme-anticorps spécifique d'une tumeur, de formule II Ac-Sp-E, dans laquelle :

Ac est un anticorps ou l'un de ses fragments, qui présente une spécificité vis-à-vis d'un antigène associé à une tumeur, ou est une biomolécule qui a tendance à s'accumuler dans une tumeur, tel que l'EGF (facteur de croissance épidermique), l' α -TGF (facteur de croissance transformant α), le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), l'IGF I+II (facteur de croissance de l'insuline I+II) ou le FGF a+b (facteur de croissance fibroblastiques a+b).

E représente une glycosidase qui n'est pas immunogène ou présente une immunogénicité très faible, de préférence une glycosidase de mammifère, telle que l' α ou la β -glucosidase, l' α -galactosidase, l' α ou la β -mannosidase, l' α -fucosidase, la N-acétyl- α -galactosaminidase, les N-acétyl- β - et N-acétyl- α -glucosaminidase ou la β -glucuronidase.

Sp (Bras) représente un groupe contenant un sulfure ou un disulfure de formule III ou IV



ou un bras polypeptidique, dans lequel

X' ou Y' représente $-CO-R_{13}-(N\text{-succinimido})-$ ou $-C(=R_{14})-CH_2-CH_2-$ avec R_{13} étant un groupement $-CH_2-CH_2-$, 1,4-cyclohexylidène, 1,3 ou 1,4 phénylène ou méthoxycarbonyl ou chloro-1,4-phénylène

et R_{14} étant un atome d'oxygène ou un groupe NH, et de plus,

Y' représente $-C(=R_{14})-CH_2-CH_2-$, lorsque R_{14} a la signification précisée ci-dessus et n représente 1 ou 2, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cytotatique.

Conformément à l'invention, aussi bien la prodrogue d'anthracycline que le conjugué enzyme-anticorps peuvent être associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Un tel conjugué enzyme-anticorps est plus particulièrement décrit dans la Demande de Brevet DE 39 35016.9, au nom de BEHRING.

Le couplage entre l'enzyme et l'anticorps, ou un fragment de celui-ci ou une biomolécule, est réalisé à l'aide d'un procédé décrit dans la littérature (A.H. BLAIR et T.I. GHOSE, Immunology Methods, 1983, 59, 129-143 ; T.I. GHOSE et al., Methods in Enzymol., 1983, 19, 280-333).

Cela implique la fonctionnalisation initiale de l'enzyme via son groupe amino, en utilisant un carboxylate de succinimidy N-maléimidoalkylidène-, cycloalkylidène ou arylène-1-, dans lequel la double liaison du groupe maléimido entre en réaction avec le groupe HS de l'anticorps fonctionnalisé, de son fragment ou des biomolécules, avec la formation d'une fonctionnalité thioéther.

Il est possible d'utiliser, pour la préparation des conjugués anticorps-enzyme, les anticorps monoclonaux décrits dans la Demande européenne 141 079, de préférence les anticorps 431/26, 250/183, 704/152 et 494/32.

La spécificité de ces anticorps pour des antigènes associés à des tumeurs a déjà été démontrée sur des animaux et chez l'Homme par des méthodes d'immunoscintigraphie et d'immunochimie.

Pour préparer les conjugués enzymatiques spécifiques d'une tumeur, il est possible, pour les enzymes qui sont mentionnées ci-après et à partir de la source identifiée, d'être purifiées par la procédure indiquée dans la littérature :

- α -galactosidase de foie humain, DEAN, K.G. and SWEETLEY, C.C. (1979), J. Biol. Chem. 254, 994-1000 ;
- β -glucuronidase de foie humain, HO, K.J. (1985), Biochim. Biophys. Acta 827, 197-206 ;
- α -L-fucosidase de foie humain, DAWSON, G., TSAY, G. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 184, 12-23 ;
- α -mannosidase de foie humain, GRABOWSKI, G.A., IKONNE, J.U., DESNICK, R.J. (1980) Enzyme 25, 13-25 ;
- β -mannosidase de placenta humain, NOESKE, C., MERSMANN, G. (1983) Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 364, 1645-1651 ;
- α -glucosidase de muqueuse gastrointestinale humaine, ASP, N.G., GUDMAND-HOEYER, E., CHRISTIANSEN, P.M., DAHLQUIST, A. (1974) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, 239-245 ;
- β -glucosidase de foie humain, DANIELS, L.B., COYLE, P.J., CHIA, Y.B., GLEW, R.H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 13004-13013 ;
- β -glucocerebrosidase de placenta humain, FURBISH, F.S., BLAIR, H.E., SHILOACH, J., PENTCHEU, P.G., BRADY, R.O. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3560-3563 ;
- α -N-acetylglucosaminidase de placenta humain, ROEHRBORN, W., VON FIGURA, K. (1978) Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 359, 1353-1362 ;
- β -N-acetylglucosaminidase de membrane amniotique humaine, ORLACCHIO, A., EMILIANI, C., DI RENZO, G.C., COSMI, E.V. (1986) Clin. Chim. Acta 159, 279-289 ;
- α -N-acetylgalactosaminidase selon SALVAYRE, R., NEGRE, A., MARET, A., DOUSTE-BLAZY, L. (1984) Pathol. Biol. (PARIS) 32, 269-284.

L'activité glycolytique des conjugués enzymes-anticorps, spécifiques de tumeur, a été déterminée, comparativement avec des glycosides de p-nitrophényle, à pH optimum.

Pour tester l'efficacité d'une utilisation séquentielle et combinée, du conjugué enzyme-anticorps et de la prodrogue, le conjugué est administré à des souris transplantées, puis après avoir attendu que le taux plasmatique d'enzyme soit revenu quasiment à zéro, l'anthracycline modifiée (prodrogue) est administrée ; on observe s'il y a arrêt de la croissance de la tumeur et si une régression s'opère.

Les prodrogues 7, 14, 48b, 49b, 60 et 75b ainsi que les acétates 6, 13, 48a, 49a, 59 et 75a, qui s'hydrolysent *in vivo* sous l'effet d'enzymes et conduisent à l'une des prodrogues précitées, sont des α -galactosides ; les prodrogues 22, 27c, 54c, 64c, 70c, 78b et 83c sont des β -glucuronides ; la prodrogue 37 et son acétate 36 sont des β -glucosides. Ces prodrogues sont avantageusement clivées en daunorubicine ou doxorubicine, selon le cas, en présence du conjugué approprié, tel que défini ci-dessus.

De manière inattendue, les compositions conformes à l'invention combinant une prodrogue à trois compartiments et un conjugué dont l'enzyme est une enzyme d'origine humaine non circulante permettent de résoudre à la fois le problème de la tolérance immunologique, de la spécificité d'action au niveau du site tumoral et comme précisé ci-dessus, évitent les interférences stériques ou électroniques, lors du clivage enzymatique.

Egalement de manière inattendue, les prodrogues à trois compartiments conformes à l'invention peuvent être clivées par des macrophages, des granulocytes, des thrombocytes ou des cellules tumorales humaines activés.

En effet, ces cellules activées libèrent de la β -glucuronidase apte à cliver efficacement (hydrolyse) les composés glucuronyl-bras auto-immolable-drogues.

De telles prodrogues sont alors directement utilisables comme médicament pour le traitement des maladies où sont impliqués des macrophages, des granulocytes, des thrombocytes ou des cellules tumorales humaines activés.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

30 **EXEMPLE 1 : synthèse de la α -D-galactopyranoside de N-(4-hydroxy-benzoyloxy-carbonyl) daunorubicine (7).**

Conformément au schéma 1, le couplage de penta-O-acétyl-D-galactopyranose avec du para-crésol est réalisé par fusion en présence de $ZnCl_2$ ou de $ZnCl_2$ dans un mélange de $AcOH-Ac_2O$.

La bromation benzyle du composé (1) obtenu est réalisée soit en présence de N-bromosuccinimide (NBS) et activation photochimique et fournit uniquement le composé 2, soit en présence de NBS et de peroxyde de benzyle et fournit principalement le composé 2 et de petites quantités du dérivé aldéhyde 3.

Le déplacement du brome du dérivé 2 est réalisé dans l'acétone ou dans l'éther-acétone avec (ou sans) $(Bu_3Sn)_2O$ et fournit le dérivé 4, alors que la réduction du dérivé aldéhyde 3 par du borohydrure de sodium fournit des quantités supplémentaires du composé 4.

L'activation du groupe OH du dérivé 4 est réalisée en utilisant le chloroformate de N-succinimidyle ou le carbonate de disuccinimidyle (DSC).

Dans une étape suivante, le couplage du dérivé 5 avec la daunorubicine est réalisé dans du DMF en présence d' Et_3N et le dérivé 6 N-hydroxybenzylcarbonyl est déprotégé par transestérification et permet l'obtention du dérivé 7 recherché.

1) 2,3,4,6-Tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-méthyl phényle (1).

- Préparations :

Procédé I : 8,9 g de p. crésol, 8,9 g de penta-O-acétyl-D-galactopyranose et 0,56 g de $ZnCl_2$ sont mélangés et portés à $160^\circ C$ et maintenus à cette température durant 30 minutes, selon la méthode d'HELPERICH. Après refroidissement jusqu'à $60^\circ C$, le milieu réactionnel est repris par 400 ml de CH_2Cl_2 , lavé par deux fois 400 ml d'eau, puis par une solution d'hydroxyde de sodium ($\approx 1N$), jusqu'à ce que la phase aqueuse soit à peine colorée. La phase organique est enfin lavée par deux fois 400 ml d'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à sec au bain-marie (température $35-40^\circ C$) pour fournir un résidu de 7,08 g (Rdt = 70 %). Une chromatographie sur colonne de silice 60 H (solvant : hexane-acétate d'éthyle : 90/10 v/v) permet d'obtenir 2,9 g du composé 1 (Rdt = 29 %) et 1,17 g de son anomère β (Rdt = 12 %).

Procédé II : 11 g de penta-O-acétyl-D-galactopyranose, 11 g de p. crésol et 2,4 g de $ZnCl_2$ sont dissous

dans 8 ml d'un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique (95/5 v/v) et portés à 120°C. Le reflux est maintenu pendant 2 heures.

Après évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu est repris par 120 ml de CH_2Cl_2 . La solution organique est lavée à l'eau, puis par une solution de soude ($\approx 1\text{N}$) et enfin lavée à l'eau avant d'être séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée à sec sous pression réduite. Un résidu brut de 7 g est ainsi obtenu (Rdt = 64 %). Après purification sur colonne de silice 60 H (solvant : hexane-acétate d'éthyle : 70/30 v/v) le produit 1 est obtenu avec un rendement de 13 % et son anomère β avec un rendement de 6,5 %.

- Composé 1 : $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$. $M = 438$, $F = 163-165^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +164^\circ$ (c 1, CHCl_3). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) : δ ppm 1,90 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 4,00 (dd, 1H, $J = 12$, $J' = 7$ Hz), 4,09 (dd, 1H, $J = 12$, $J' = 6$ Hz), 4,40 (ddd, 1H, $J = 7$, $J' = 5$, $J'' = 1$ Hz), 5,27 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,54 (dd, 1H, $J = 4$, $J' = 1$ Hz), 5,57 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,73 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 6,90 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,10 (d, 2H, $J = 8$ Hz). SM. (DIC/ NH_3) : m/z 456 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$, 331.

2) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-bromométhyl phényle (2).

- Préparation :

1) avec activation photochimique :

A une solution de 1 (2,5 g) dans 100 ml de tétrachlorure de carbone, on ajoute 1,02 g de N-bromosuccinimide, et on chauffe au reflux à 80°C avec irradiation lumineuse (1000 W) pendant 15 min. Après refroidissement, le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le succinimide qui a précipité, puis le filtrat est évaporé sous pression réduite, ce qui permet d'obtenir 3,23 g de résidu sec. On isole 2,45 g de 2 après purification sur colonne de silice 60 H (solvant : hexane-acétate d'éthyle : 70/30 v/v) (Rdt = 83 %).

2) avec activation par le peroxyde de benzoyle :

A une solution de 1 g du produit 1 dans 40 ml de tétrachlorure de carbone, on ajoute 0,8 g de N-bromosuccinimide et 0,08 g de peroxyde de benzoyle. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux et pendant 3 h. Après refroidissement, le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le succinimide qui a précipité, puis le filtrat est évaporé à sec pour obtenir 1,64 g de produit. Une "flash chromatographie" (solvant : hexane-acétate d'éthyle : 80/20 v/v) permet d'obtenir 1,74 g d'un mélange du dérivé monobromé 2 et du dérivé dibromé correspondant et d'isoler 0,08 g du composé 3 pur.

- Composé 2 : $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_{10}\text{Br}$. $M = 517$. $F = 187^\circ\text{C}$ (CCl_4). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +26^\circ$ (c 1, CHCl_3). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) : δ ppm : 1,94 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 4,06 (dd, 1H, $J = 12$, $J' = 7$ Hz), 4,12 (dd, 1H, $J = 12$, $J' = 6$ Hz), 4,32 (ddd, 1H, $J = 7$, $J' = 6$, $J'' = 1$ Hz), 4,49 (s, 2H), 5,29 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,55 (dd, 1H, $J = 4$, $J' = 1$ Hz), 5,60 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,78 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 7,02 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,33 (d, 2H, $J = 8$ Hz). SM (DIC/ NH_3) : m/z 536 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$, 534 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$, 456, 331.

3) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-formyl phényle (3).

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$. $M = 452$. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) : δ ppm : 1,91 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 4,09 (m, 2H), 4,28 (ddd, 1H, $J = 7$, $J' = 6$, $J'' = 1$ Hz), 5,30 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,52 (m, 2H), 5,88 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 7,17 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,83 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 9,89 (s, 1H). SM (DIC/ NH_3) : m/z 470 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$, 331.

4) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-hydroxyméthyl phényle (4).

- Préparation :

Une solution de 1,89 g du composé 2 dans 80 ml d'acétone est mélangée à un volume égal d'une solution aqueuse de nitrate d'argent 0,1 N. Le mélange est agité à 25°C pendant 2 h puis l'acétone est évaporée sous pression réduite et la phase aqueuse restante est extraite par CH_2Cl_2 , lavée à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu sec obtenu (1,52 g) est ensuite purifié sur colonne de silice "flash" (solvant : hexane-acétate d'éthyle : 60/40 v/v). Le produit 4 (0,94 g) est obtenu avec un rendement de 56 %.

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$. $M = 454$. $F = 153^\circ\text{C}$ (CH_2Cl_2). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +144,5^\circ$ (c 1, CHCl_3). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,73 (1H, échang. D_2O), 1,96 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 4,07 (dd, 1H, $J = 12$, $J' = 7$ Hz), 4,09 (dd, 1H, $J = 12$, $J' = 6$ Hz), 4,35 (ddd, 1H, $J = 7$, $J' = 6$, $J'' = 1$ Hz), 4,64 (s, 2H), 5,28 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,51 (dd, 1H, $J = 4$, $J' = 1$ Hz), 5,54 (dd, 1H, $J = 10$, $J' = 4$ Hz), 5,60 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 7,04 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,30 (d, 2H, $J = 8$ Hz). SM (DIC/ NH_3) : m/z 472 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$, 331.

5) Carbamate de 2,5-di oxopyrrolidin-1-yle et de 4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-benzyle (5).

Le composé 4 est transformé en succinimido-carbonate par couplage avec le succinimido-chloroformiate.

5 a) Préparation du succinimido-chloroformiate :

Une solution de 2 g de N-hydroxysuccinimide dans 11 ml d'éthanol est mélangée à une solution de 1 g de potasse dans 30 ml d'éthanol. Le produit formé est filtré, lavé à l'éther et séché une nuit à 40°C sous vide. On obtient ainsi 2,40 g du sel potassique de l'hydroxysuccinimide (Rdt : 94 %).

200 mg du sel potassique du N-hydroxysuccinimide sont ajoutés, sous agitation, à 3 ml d'une solution à 20 % de COCl_2 dans le toluène à 5°C. Après 2 h sous agitation, le chlorure de potassium formé est éliminé par filtration et le filtrat évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans l'éther et un solide blanc, constitué de disuccinimido-carbonate, se dépose et est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite pour donner 150 mg de succinimido-chloroformiate (Rdt = 54 %).

b) Préparation du succinimido-carbonate :

150 mg du composé 4 sont additionnés à 117 mg de succinimido-chloroformiate et à 0,05 ml de pyridine dans 8 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est agité 48 h à température ambiante, filtré et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour fournir 189 mg du composé 5 (Rdt = 96 %) : $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_{15}\text{N}$. M = 595. Laque. $[\alpha]_D^{20} = +142^\circ$ (c 0,3, CHCl_3). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,90 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,83 (s, 4H), 4,07 (dd, 1H, J = 12, J' = 7 Hz), 4,11 (dd, 1H, J = 12, J' = 6 Hz), 4,30 (ddd, 1H, J = 7, J' = 6, J'' = 1 Hz), 5,26 (s, 2H), 5,29 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,51 (dd, 1H, J = 4, J' = 1 Hz), 5,55 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,77 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,07 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,33 (d, 2H, J = 8 Hz). SM (DIC/NH_3) : m/z 613 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺, 437, 348, 331.

6) N-[4-(2,3,4,6-tétra-o-acétyl- α -D-galactopyranosyl) benzyloxycarbonyl] daunorubicine (6).

- Préparation :

20 mg de daunorubicine sont dissous dans 0,8 ml de diméthylformamide. 23 mg de 5 et une goutte de triéthylamine sont ajoutés à cette solution, maintenue sous agitation sous argon durant 10 minutes à température ambiante.

Le milieu réactionnel est repris par l'acétate d'éthyle, puis extrait par une solution saturée de NaCl.

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. Les 50 mg de résidu sec obtenu sont purifiés sur colonne de silice 60 H (solvant : acétone-cyclohexane : 45/55 v/v) et permettent d'obtenir 13 mg du produit attendu 6 (Rdt = 32 %).

- Composé 6 : $\text{C}_{49}\text{H}_{53}\text{NO}_{22}$. M = 1007. Amorphe. $[\alpha]_D^{20} = +278^\circ$ (c 0,7, CHCl_3). RMN ^1H (270 MHz, DMSO) δ ppm : 1,08 (d, 3H, J = 7 Hz), 1,40-2,20 (m, 4H), 1,76 (s, 3H), 1,91 (s, 3H), 1,96 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,91 (s, 2H), 3,31 (m, 1H), 3,66 (ddt, 1H, J = 12, J' = 8, J'' = 4 Hz), 3,93-4,00 (m, 5H), 4,13 (dd, 1H, J = 7, J' = 4 Hz), 4,30 (ddd, J = 7, J' = 6, J'' = 1 Hz), 4,70 (d, 1H, J = 6 Hz), 4,88 (m, 3H), 5,10 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,17 (m, 1H), 5,37 (m, 2H), 5,53 (s, 1H), 5,74 (d, 1H, J = 4 Hz), 6,84 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,03 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,26 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,64 (m, 1H), 7,88 (m, 2H). SM (DIC/NH_3) : m/z 1025 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺, 376.

7) N-[4-(α -D-galactopyranosyl)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (7).

- Préparation :

Une solution de 9 mg de 6 dans 1 ml de méthanolate de sodium 0,1 N est agitée et maintenue à 0°C pendant 15 minutes. Le milieu est neutralisé par addition de résine Amberlite IRC 120H⁺, puis filtré. Le filtrat, évaporé à sec sous pression réduite, fournit 6,7 mg du composé 7 pur (Rdt = 39 %).

- Composé 7 : $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{NO}_{18}$. M = 839. Amorphe. $[\alpha]_D^{20} = +243^\circ$ (c 0,01, MeOH). RMN ^1H (270 MHz, CD_3OD) δ ppm : 1,34 (d, 3H), 1,50-4,00 (m, 11H), 4,50-5,50 (m, 9H), 7,06 (d, 2H, J = 3Hz), 7,23 (d, 2H, J = 8Hz), 7,30-7,60 (m, 3H). SM (DIC/NH_3) : m/z 571, 554, 459, 383, 286, 164.

EXEMPLE 2 : synthèse de la N-[2-(α -D-galactopyranosyl) benzyloxycarbonyl] daunorubicine (14).

Conformément au schéma II, en utilisant comme produit de départ le glycoside 8 et en utilisant les mêmes séquences de réactions, à savoir (i) bromation benzylique ; (ii) solvolysse du dérivé bromé ; (iii) activation du groupe OH par du chloroformiate de succinimidyl ; (iv) couplage de 12 avec la daunorubicine et déprotection des groupes OH du résidu sucré, que celles décrites à l'exemple 1, on obtient le produit recherché (14).

1) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-brom méthyl phényle (9).

- Préparation :

A partir du 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-méthyl phényle 8 (Réf : P.M. DEY, Chemistry and industry (London), 39, 1637, 1967) en utilisant NBS- CCl_4 (Rdt : 80 %).

- Composé 9 : $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{BrO}_{10}$. M = 517. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,96 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 4,14 (m, 2H), 4,40 (t, 1H, J = 6 Hz), 4,60 (ABq, 2H, J = 9 Hz), 5,38 (dd, 1H, J = 11 et 4 Hz), 5,50-5,75 (m, 2H), 5,85 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,00-7,40 (m, 4H).

2) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-hydroxyméthyl phényle (11).

- Préparations :

a) à partir de 9 en utilisant AgNO_3 (Rdt 21 %) ;

b) à partir de 10 en utilisant NaBH_4 -THF-MeOH (Rdt : 80 %).

- Composé 11 : $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$. M = 454. F = 96 °C. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,98 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 4,15 (m, 2H), 4,43 (t, 1H, J = 6 Hz), 4,57 (d, 1H, J = 12,5 Hz), 4,89 (d, 1H, J = 12,5 Hz), 5,30-5,60 (m, 3H), 5,72 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,00-7,40 (m, 4H).

3) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-formyl phényle (10).

- Préparation :

à partir de 8 par bromation, puis en utilisant AgNO_3 (Rdt : 52 %).

- Composé 10 : $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$. M = 452. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 2,00 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 4,18 (m, 2H), 4,43 (t, 1H, J = 6 Hz), 5,38 (d, 1H, J = 11 Hz), 5,40-5,60 (m, 2H), 5,84 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,19 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,30 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,58 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,91 (d, 1H, J = 8 Hz), 10,56 (s, 1H).

4) Carbonate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yle et de 2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl) benzyle (12).

- Préparation :

à partir de 11, en utilisant le succinimido-chloroformiate (cf. préparation de 5, Rdt : 72 %).

- Composé 12 : $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_{15}$. M = 595. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,98 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,87 (sl, 4H), 4,15 (m, 2H), 4,43 (t, 1H, J = 6 Hz), 5,16 (d, 1H, J = 12 Hz), 5,33 (dd, 1H, J = 12 et 4 Hz), 5,40-5,90 (m, 5H), 7,10 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,20-7,50 (m, 3H).

5) N-[2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (13).

- Préparation :

à partir de 12 et de la daunorubicine (Rdt 85 %), selon le protocole décrit pour 6.

- Composé 13 : F = 130 °C. $[\alpha]_D^{20} = +216^\circ$ (c 0,25, CHCl_3). $\text{C}_{49}\text{H}_{53}\text{NO}_{22}$. M = 1007. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,87 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,94 (d, 1H, J = 18 Hz), 3,23 (d, 1H, J = 18 Hz), 3,66 (s, 1H), 3,70-4,20 (m, 6H), 4,08 (s, 3H), 5,10 (ABq, 2H, J = 9 Hz), 5,20-5,70 (m, 7H), 5,85 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,00-7,50 (m, 4H), 7,78 (t, 1H, J = 8 Hz), 8,03 (d, 1H, J = 8 Hz), 13,28 (s, 1H), 13,98 (s, 1H).

6) N-[2-(α -D-galactopyranosyl)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (14).

- Préparation :

à partir de 13, en utilisant MeONa (cat)-MeOH (cf. Préparation de 7, Rdt : 83 %). $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{NO}_{18}$. M = 839. F = 130 °C.

EXEMPLE 3 : synthèse de la β -D-glucuronide de N-(4-hydroxy-benzyloxycarbonyl) daunorubicine (22).

55

Conformément au schéma III, le couplage de per-O-acétyl-D-glucuronate de méthyle avec du para crésol est réalisé dans une solution de CH_2Cl_2 en présence de TMSOTf comme catalyseur.

La préparation du dérivé 22 est ensuite réalisée à l'aide des mêmes séquences de réactions que celles

des exemples 1 et 2, à l'exception de la déprotection additionnelle du groupe carbométhoxy, qui est réalisée par mélange dans du MeOH en présence de BaO.

1) (2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 4-bromométhyl-phényle) uronate de méthyle (16).

Il est obtenu (Rdt 79 %) selon le procédé indiqué pour 2 (voir exemple 1), à partir de (2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 4-méthylphényle) uronate de méthyle (15), obtenu comme décrit dans G.N. BOLLENBACK, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 3310-3315.

$C_{20}H_{23}O_{10}Br$, M = 503. F = 144-146°C (éthanol). $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ (c 0,85, $CHCl_3$). I.R. ($CDCl_3$) : 1758 (CO) cm^{-1} . RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,00 (s, 9H), 3,66 (s, 3H), 4,16 (m, 1H), 4,43 (s, 2H), 5,03-5,36 (m, 4H), 6,89-7,33 (AB, 4H). SM (DIC/ NH_3) : m/z 521 ($M+NH_4$)⁺.

2) (2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 4-hydroxyméthylphényle) uronate de méthyle (18) et (2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 4-formylphényle) uronate de méthyle (17).

Ils sont obtenus à partir de 16 (1,2 g, 2,3 mmol) selon le procédé indiqué précédemment pour l'obtention de 4 (exemple 1). Une chromatographie du résidu sur gel de silice, avec élution par un mélange hexane/acétate d'éthyle (2:1, v/v) permet d'isoler du produit de départ 16 (100 mg) ; 18 (650 mg, 38 %) puis 17 (200 mg, 12 %).

- Composé 18 : $C_{20}H_{24}O_{11}$, M = 440. F = 134-136°C ; $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ (c 0,55, $CHCl_3$) ; I.R. (KBr) : 3556 (OH), 1758 (CO) cm^{-1} ; RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,96 (s, 9H), 3,63 (s, 3H), 3,96-4,20 (m, 2H) ; 4,53 (s, 2H) ; 4,96-5,33 (m, 4H) ; 7,20 et 6,86 (AB, 4H). SM (DIC/ NH_3) : m/z : 458 ($M+NH_4$)⁺.

- Composé 17 : $C_{20}H_{22}O_{11}$, M = 438. F = 170-172°C ; $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ (c 0,95, $CHCl_3$) ; I.R. ($CDCl_3$) : 1758 (C=O, ester), 1698 (C=O, PhCHO) cm^{-1} ; RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,12 (s, 9H), 3,72 (s, 3H), 4,21-4,39 (m, 1H), 5,30-5,56 (m, 4H), 7,07-8,03 (dd, 4H), 9,91 (s, 1H). SM (DIC/ NH_3) m/z : 456 ($M+NH_4$)⁺.

3) Carbonate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yle et de 4-((2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyle (19).

- Préparation : Une solution de 18 (170 mg, 0,39 mmol) et de triéthylamine (54 μl, 0,39 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (4 ml) est ajoutée sous argon goutte à goutte à une solution de DSC (197 mg, 0,77 mmol) dans 8 ml d'acétonitrile. Après 24 h d'agitation à température ambiante, le milieu est filtré et le filtrat concentré jusqu'à sécheresse. Le produit 19 est obtenu (117 mg, 52 %) sous la forme d'un sirop incolore.

- Composé 19 : $C_{25}H_{27}NO_{15}$, M = 581. $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ (c 0,85, $CHCl_3$). I.R. ($CDCl_3$) : 1747 (C=O) cm^{-1} . RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,08 (s, 9H), 2,82 (s, 4H), 3,73 (s, 3H), 4,24 (d, 1H, J = 9), 5,13-5,44 (m, 6H), 6,98-7,44 (m, 4H). SM (DIC/ NH_3) m/z : 599 ($M+NH_4$)⁺.

4) N-[[4-((2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl)-benzyloxycarbonyl) uronate de méthyle] daunorubicine (20).

- Préparation :

Selon le procédé indiqué pour obtenir 6 et 13 (Rdt 70 %) (voir exemples 1 et 2).

- Composé 20 : Produit amorphe. $C_{48}H_{51}NO_{22}$, M = 993. $[\alpha]_D^{20} = +112^\circ$ (c 0,06, $CHCl_3$). RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,32 (d, 3H, J = 6 Hz), 1,74 (s, 1H), 1,77 et 1,95 (AB, 2H, J = 5, J' = 12), 2,07 (3s, 9H), 2,12-2,38 (AB, 2H), 2,44 (s, 3H), 2,97 et 3,26 (AB, 1H, J = 20), 3,70 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,92 (large s, 1H), 4,12 (s, 3H), 4,19 (m, 1H), 5,00 (s, 2H), 5,14 (d, 1H, J = 7), 5,68 (dd, J = 3, J' = 7, 1H), 5,53 (d, 1H, J = 3,5), 6,98 et 7,28 (AB, 4H, J = 8), 7,43 (d, 1H, J = 8), 7,83 (t, 1H, J = J' = 8), 8,07 (d, 1H, J = 8), 13,33 et 14,00 (2s, 2H). SM(FAB) : m/z : 1016 ($M+Na$)⁺.

5) N-[[4-(β-D-glucopyranosyl)-uronate de méthyle-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (21).

Par traitement MeONa-MeOH de 20. (cf. préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2, Rdt 78 %). Sirop rouge. $C_{42}H_{45}NO_{19}$, M = 867. $[\alpha]_D^{20} = +140^\circ$ (c 0,02, CH_3OH). SM (252C FPD) : m/z : 890 ($M+Na$)⁺.

6) β-D-glucuronide de N-(4-hydroxy-benzyloxycarbonyl) daunorubicine (22).

Le composé 21 (2,7 mg) est dissous dans 0,2 ml de MeOH et l'on agite durant 3 h à température ambiante en présence d'oxyde de baryum. Le milieu est ensuite neutralisé par addition de résine Amberlit IR 50 H+

après filtration on concentre sous pression réduite. On isole 1,8 mg de 22 pur par précipitation dans un mélange M. OH/Et₂O/hexane. C₄₁H₄₃NO₁₉, M = 853. $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ (c 0,06, MeOH).

EXEMPLE 4 : synthèse de la N-[(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) acide uronique]-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (27c).

Conformément au schéma IV, le méthyl 2-bromométhylphényl-(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate 23, obtenu à partir du méthyl 2-méthyl-phényl-(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate, comme décrit dans G.N. BOLLENBACK et al. (J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 3310), est converti en produit 24 (et/ou en produit 25) puis le produit 24 est transformé en produit 26.

Dans ce cas, pour lier le bras à l'anthracycline, le carbonate 26 est préparé à l'aide de chloroformiate d'4-nitrophényle disponible dans le commerce.

Le composé 27c (prodrogue recherchée) est ensuite obtenu comme décrit ci-dessus aux exemples 1, 2 et 3.

1) (2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 2-bromométhyl phényl) uronate de méthyle (23).

- Préparation :

Une solution de méthyl 2-méthyl-phényl-(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle (940 mg, 2,2 mmol) (réf. : G.N. BOLLENBACK, J. Am. Chem. Soc., 77, 3310-3315, 1955), de NBS (509 mg, 2,86 mmol) et de 52 mg de peroxyde de benzoyle dans 25 ml de CCl₄ est portée au reflux durant 12 h. Après extraction classique et purification sur colonne de silice, on isole 880 mg de 23 (80 %).

- Composé 23 : C₂₀H₂₃BrO₁₀, M = 503. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm : 2,05 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 4,19 (d, 1H, J = 9 Hz), 4,35 et 4,65 (2d, CH₂, J = 12 Hz), 5,23 (m, 1H), 5,38 (m, 3H), 7,05 (m, 2H), 7,32 (m, 2H).

2) (2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 2-hydroxy-1-méthyl phényl) uronate de méthyle (24) et d'2-formyl phényl) uronate de méthyle (25).

- Préparation :

Une solution de dérivé bromé 23 (690 mg, 1,37 mmol) dans 14 ml d'une solution acétone/eau (50/50) est agitée durant 2 h en présence de 631 mg (3,7 mmol) de AgNO₃. Après filtration et extraction classique, on isole par chromatographie sur gel de silice, 80 mg d'aldéhyde 25 (13 %) et 340 mg d'alcool 24 (56 %).

Caractéristiques de 24 : C₂₀H₂₄O₁₁, M = 440. F = 143-147°C. $[\alpha]_D^{20} = -26^\circ$ (c 0,9, CHCl₃). RMN (200 MHz, CDCl₃) : 2,05 (s, 3H) ; 2,07 (s, 3H) ; 2,11 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 4,13 (d, J = 9 Hz, H-5) ; 4,48 et 4,77 (2d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,15 (d, J = 7,2 Hz, 1H) ; 5,35 (m, 3H) ; 7,02 (d, J = 8 Hz, 1H) ; 7,11 (t, J = 7,2 Hz, 1H) ; 7,29 (d, J = 6,8 Hz, 1H) ; 7,34 (t, J = 7,4 Hz, 1H) ppm. I.R. (CH₂Cl₂) : 3540, 3030, 2960, 1760, 1605, 1590, 1490, 1455, 1440, 1375, 1225, 1140, 1090, 1075, 1040 cm⁻¹. SM (FAB⁺) m/z : 463 (M+Na)⁺.

- Composé 25 : C₂₀H₂₂O₁₁, M = 438. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm : 2,08 (s, 9H), 3,75 (s, 3H), 4,25 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,34 (m, 4H), 7,15 (t, 1H, J = 8,6 Hz), 7,25 (d, 1H, J = 7,3 Hz), 7,58 (t, 1H, J = 7 Hz), 7,26 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 10,34 (s, 1H).

3) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-[(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle]-benzyle (26).

- Préparation :

Une solution de 24 (33 mg, 0,075 mmol) dans 0,021 ml de pyridine et 0,2 ml d'acétate d'éthyle est maintenue sous agitation pendant 12 h à température ambiante en présence de 46 mg (0,22 mmol) de chloroformiate de paranitrophényle. Après filtration et évaporation des solvants, une purification sur plaque de silice donne 45 mg de 26 (rendement quantitatif).

- Composé 26 : C₂₇H₂₇NO₁₅, M = 605. F = 67-70°C. $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ (c 1, CDCl₃). RMN ¹H (200 MHz, CHCl₃) δ ppm : 2,07 (s, 9H) ; 3,74 (s, 3H), 4,24 (d large, J = 8,5 Hz, H-5), 5,3 (m, 6H), 7,10 (m, 2H), 7,39 (m, 4H), 8,27 (d, J = 9 Hz, 2H).

4) N-[(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle]-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (27a).

- Préparation :

Une solution de daunorubicine (15,8 mg, 0,03 mmol) et de glycoside 26 (1,1 éq., 19,8 mg) t d Et₃N (3,6 mg, 1,2 éq.) dans 0,1 ml de DMF est maintenue sous agitation pendant 12 heures. Après extraction classique, une purification sur plaque de silice permet d'obtenir 20 mg (67 %) de 27.

- Composé 27a : C₄₈H₅₁NO₂₂, M = 993. F = 153-155°C. [α]_D²⁰ = +122° (c 0,4, CHCl₃). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ ppm : 1,31 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 2,06 (s, 6H), 2,09 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,91 et 3,24 (2d, J = 19 Hz, 2H), 3,60 (s, 3H), 4,08 (s, 3H), 4,20 (m, 2H), 5,00-5,32 (m, 8H), 7,05 (m, 2H), 7,26 (m, 2H), 7,38 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,77 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 13,24 (s, 1H), 12,57 (s, 1H). SM : [M+K]⁺ = 1032.

5) N-[2-((β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle) benzyloxycarbonyl] daunorubicine (27b).

Par traitement MeONa-MeOH de 27a (cf. préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2). Solide rouge. C₄₂H₄₅O₁₉N, M = 867.

6) N-[2-((β-D-glucopyranosyl) acide uronique)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (27c).

Par traitement de 27b avec BaO ou K₂CO₃ (cf. préparation de 22 dans l'exemple 3). Solide rouge. C₄₁H₄₃NO₁₉, M = 853.

EXEMPLE 5 : synthèse de la N-[2-hydroxybenzyloxycarbonyl] daunorubicine (32).

Conformément au schéma V, le dérivé 32 est préparé soit par synthèse à partir du dérivé 28 (2-tertiobutyldiméthylsilyloxy-benzaldéhyde), qui est réduit en présence de NaBH₄ pour donner le composé 29, l'activation par le chloroformiate de 4-nitrophényle conduit au dérivé 30 qui est condensé avec la daunorubicine, le produit 32 est ensuite obtenu par déprotection au KF, soit par hydrolyse enzymatique du produit 14 (voir exemple 2) par l'α-galactosidase.

1) N-[2-hydroxy-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (32).

a) Hydrolyse enzymatique de 14 :

Le composé 14 (1 mg) est dissous dans 0,02 ml de DMF. On ajoute alors 1 ml d'une solution 100 mM d'HEPES dans l'eau distillée. Après addition d'α-galactosidase (2U, EC 3.2.1.22, Sigma, n° G-8507), le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures à 35°C. Après hydrolyse et extraction on obtient quantitativement le composé 32.

b) Hydrolyse de 31 :

Le dérivé silylé 31 (2 mg, 0,0025 mmol) est dissous dans le THF (0,1 ml). On ajoute alors 0,2 ml d'une solution aqueuse de KF (à 0,1 g par mL). Après 12 heures à température ambiante une extraction usuelle fournit 32.

- Caractéristiques de 32 : C₃₅H₃₅NO₁₃, M = 677. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,26 (d, J = 6 Hz, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,89 (d, J = 20 Hz, 1H), 3,24 (d, J = 20 Hz, 1H), 3,61 (s, 1H), 4,07 (s, 3H), 4,43 (s, 1H), 5,00 (s, 2H), 5,28 (s large, 1H), 5,47 (d, J = 2 Hz, 1H), 6,7-7,3 (m, 4H), 7,40 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,80 (t, J = 8 Hz, 1H), 8,00 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,78 (s, 1H), 13,27 (s, 1H), 13,96 (s, 1H).

Le produit 32 peut être avantageusement condensé avec un sucre pour fournir les produits 27a, 27b ou 27c.

2) 2-tertiobutyldiméthylsilyloxy-benzaldéhyde (28).

- Préparation :

Une solution de 2-hydroxy benzaldéhyde (500 mg, 4,44 ml, 4,09 mmol), d'imidazole (685 mg) et de chlorure de tertibutyldiméthylsilyle (680 mg) dans le DMF est agitée pendant 24 heures à température ambiante. Après hydrolyse et extraction usuelle, une chromatographie permet d'obtenir 28 (890 mg, 93 %).

- Composé 28 : C₁₃H₂₀O₂Si, M = 236. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm : 0,28 (s, 6H), 1,00 (s, 9H), 0,91 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,02 (t, J = 8 Hz, 1H), 7,46 (t, J = 8 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 8 Hz, 1H), 10,47 (s, 1H).

3) alcool 2-tertiobutyldiméthylsilyloxy benzylique (29).

- Préparation :

Une solution de 28 (200 mg) dans le méthanol (5,5 ml) contenant NaBH₄ (28 mg) est agitée pendant 1 heure à température ambiante. Après hydrolyse et extraction usuelle, on obtient 29 (140 mg, 68 %).

- Composé 29 : $C_{13}H_{22}O_2Si$, $M = 238$. RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0,30 (s, 6H), 1,06 (s, 9H), 2,67 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 6,86 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 6,97 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7,20 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7,33 (d, $J = 8$ Hz, 1H).

5 4) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-(tertiobutyldiméthylsilyloxy)-benzyle (30).

- Préparation :

L'alcool 29 (135 mg, 0,56 mmol) est dissous dans l'acétate d'éthyle (0,82 ml). On ajoute alors de la pyridine (0,081 ml) puis le chloroformate de 4-nitro phényle (275 mg, 2,4 éq.). Après une nuit à température ambiante, le solvant est évaporé. Une chromatographie sur gel de silice fournit le carbonate 30 (206 mg, 91 %).

- Caractéristiques de 30 : $C_{20}H_{25}NO_6Si$, $M = 403$. RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0,27 (s, 6H), 1,03 (s, 9H), 5,32 (s, 2H), 6,86 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 6,96 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7,1-7,5 (m, 4H), 8,21 (d, $J = 8$ Hz, 2H).

5) N-[2-(tertiobutyldiméthylsilyloxy)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (31).

15

- Préparation :

Une solution de 30 (8,3 mg, 0,022 mmol), de daunorubicine (9,6 mg, 0,018 mmol) et de triéthylamine (0,003 ml) dans le DMF (0,1 ml) est agitée pendant 4 heures à température ambiante. Après extraction usuelle, une chromatographie permet de séparer 31 (6 mg, 41 %) et 32 (4,5 mg, 36 %).

20

- Composé 31 : $C_{41}H_{49}NO_{13}Si$, $M = 791$. NMR 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0,20 (s, 6H), 0,96 (s, 9H), 1,30 (d, $J = 6$ Hz, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,9 (m, 2H), 3,24 (d, $J = 20$ Hz, 1H), 3,65 (s large, 1H), 3,90 (s large, 1H), 4,09 (s, 3H), 4,48 (s, 1H), 5,06 (s, 2H), 5,28 (s, 1H), 5,52 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 6,8-7,0 (m, 4H), 7,42 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,80 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 13,31 (s, 1H), 14,0 (s, 1H).

25

EXEMPLF. 6 : synthèse de la N-[4-(β -D-glucopyranosyl) benzyloxycarbonyl] daunorubicine (37).

Conformément au schéma VI, une catalyse par transfert de phase est utilisée pour la condensation du p-acétyl- α -D-glucose avec le p. hydroxybenzaldéhyde et le glycoside 33 est converti en composé 37, conformément aux exemples 1, 2, 3, 4 ou 5 ci-dessus.

30

1) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-formyl phényle (33).

- Préparation :

On dissout le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-bromoglucose (2 g, 4,8 mmol) dans 20 ml de chloroforme. On ajoute dans la solution précédente un mélange de p-hydroxy-benzaldéhyde (585 mg, 4,8 mmol) et de bromure de benzyltriéthylammonium (1,1 g), préalablement dissous dans une solution de soude 1,25 N (10 ml), et l'on chauffe à reflux pendant 24 h. On effectue une extraction avec 50 ml d'eau. La phase organique obtenue est lavée successivement avec une solution de NaOH 1N (2 x 50 ml), avec une solution de HCl (1N), puis avec de l'eau, séchée et concentrée jusqu'à sécheresse. Le produit brut obtenu est ensuite recristallisé dans de l'éthanol pour donner 33 (0,5 g, 23 %).

40

- Composé 33 : $C_{21}H_{24}O_{11}$, $M = 452$. $F = 150-152^\circ C$: $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ (c 0,5, $CHCl_3$). I.R. ($CDCl_3$) : 1757 (C=O, ester), 1698 (C=O, aldéhyde) cm^{-1} . RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,09 (s, 12H), 3,99 (m, 1H), 4,22 (AB, 1H), 4,33 (AB, 1H), 5,13-5,48 (m, 4H), 7,15 et 7,89 (AB, 4H, $J = 12$ Hz), 9,96 (s, 1H). SM (DIC) : m/z : 470 ($M+NH_4$) $^+$.

45

2) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-hydroxyméthyl phényle (34).

- Préparation :

Il est obtenu à partir de 33 selon le procédé utilisé pour préparer 11 à partir de 10 (voir exemple 2) et cristallise de l'éthanol (Rdt 92 %).

50

- Composé 34 : $C_{21}H_{26}O_{11}$, $M = 454$. $F = 102-103^\circ C$: $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ (c 0,5, $CHCl_3$). I.R. ($CDCl_3$) : 1757 (C=O, ester) cm^{-1} . RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,98-2,03 (4s, 12H, 4 OAc), 3,75-3,84 (m, 1H, H-5), 4,11 (AB, $J_{gem} = 6$ Hz, H-6a), 4,57 (s, 1H, OH), 4,99-5,25 (m, 4H, H-1, H-2, H-3 et H-4), 6,92 et 7,24 (AB, $J_{gem} = 8$ Hz, 4H, Ph). SM (DIC) : m/z : 472 ($M+NH_4$) $^+$.

55

3) Carbamate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle et de 4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl)-benzyle (35).

- Préparations :

5 Méthode A : Par activation par le succinimido-chloroformiate (cf. : préparation de 5, exemple 1) du composé 34 (617 mg, 1,36 mmol). On obtient le produit pur 35 (780 mg, 95 %).

Méthode B : Par activation par le DSC (cf. : préparation de 19, exemple 3) du composé 34 (Rdt 80 %).

10 - Composé 35 : $C_{28}H_{29}O_{13}N$, M = 595. F = 164°C ; $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ (c 0,09, $CHCl_3$) ; I.R. (KBr) : 1791 (C=O) cm^{-1} . RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,02 (4s, 12H), 2,77 (s, 4H), 3,81 (m, 1H), 4,14 (AB, J = 12 Hz, 1H), 4,24 (AB, J = 5 Hz, 1H), 5,02-5,31 (m, 6H), 6,95-7,31 (AB, J = 12 Hz, 4H). SM (DIC/ NH_3) m/z : 613 ($M+NH_4$) $^+$.

4) N-[4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) benzyloxycarbonyl] daunorubicine (36).

- Préparation :

15 Par condensation du composé 35 (26 mg, 0,04 mmol) sur la daunorubicine (20 mg, 0,04 mmol) (cf. préparation de 6 et de 13, exemples 1 et 2). On isole le dérivé 36 pur (25 mg, 90 %) sous forme d'une laque rouge.

20 - Composé 36 : $C_{49}H_{53}O_{22}N$, M = 1007. $[\alpha]_D^{20} = 135^\circ$ (c 0,04, $CHCl_3$). I.R. ($CDCl_3$) : 3435 (OH) ; 1758 (C=O) cm^{-1} . RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,29 (d, 3H, J = 5 Hz), 1,79 (AB, 1H, J = 3,5 Hz), 1,91 (AB, 1H, Jgem = 14 Hz), 2,07 (4s, 12H), 2,15 (AB, 1H, J = 3,5 Hz), 2,35 (AB, 1H, J = 18 Hz), 2,50 (s, 3H), 2,95 (AB, 1H, J = 18 Hz), 3,25 (AB, 1H, J = 18 Hz), 3,70 (m, 1H), 3,84-3,90 (m, 1H), 3,92 (1H, OH), 4,11 (s, 3H, OMe), 4,17 (AB, 1H, J = 2 Hz), 4,24 (m, 1H), 4,30 (AB, 1H, J = 12 Hz), 5,00 (s, 2H), 5,08 (d, 1H, J = 7 Hz), 5,14 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 5,17 (t, 1H, J = J' = 10 Hz), 5,24-5,34 (m, 3H), 5,23 (dd, 1H, H-1, J < 0,5 Hz, J' = 3,5 Hz), 6,96 et 7,28 (AB, 4H), 7,42 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,82 (t, J = J' = 8 Hz), 8,07 (d, 1H, J = 8 Hz), 13,25 (s, 1H), 14,00 (s, 1H). SM (DIC/ NH_3) : m/z : 1026 ($M+NH_4$) $^+$.

5) N-[4-(β-D-glucopyranosyl)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (37).

Par MeONa cat.-MeOH sur le composé 36 (91 %), 37 est obtenu sous la forme d'un sirop rouge.

30 $C_{41}H_{45}O_{18}N$, M = 839. $[\alpha]_D^{20} = +200^\circ$ (c 0,001, CH_3OH). I.R. (KBr) : 3422 (OH) ; 1617 (C=O) cm^{-1} . SM (FAB) : m/z : 838 ($M+1$) $^+$.

EXEMPLE 7 : préparation de la N-[4-hydroxy-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (38).

35 Selon le schéma VII, le dérivé 38 est préparé soit par synthèse, soit par hydrolyse enzymatique, conformément à l'exemple 5 (dérivé 32).

1) N-[4-hydroxy-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (38).

40 Le composé 37 (3 mg, 3,68 μ mol) est dissous dans une solution tampon d'acétate de sodium, pH 5,5 (0,46 ml), puis une suspension d'enzyme (20 μ l, 5 U de β-D-glucosidase (20 mg de β-D-glucosidase dans 400 μ l d'eau plus 80 μ l d'éthanol) est ajoutée à 37°C pendant 15 min. La réaction enzymatique est complète. On filtre, évapore les solvants, puis on chromatographie le résidu sur gel de silice à l'aide du mélange CH_2Cl_2 - CH_3OH (9:1, v/v). On isole le dérivé 38 pur (1,5 mg, 60 %), qui se présente sous la forme d'un liquide rouge sirupeux.

$C_{35}H_{35}O_{13}N$, M = 676.

45 Le composé 38 peut avantageusement être condensé avec un autre sucre et notamment un dérivé de l'acide glucuronique pour fournir les produits 20, 21 ou 22.

2) alcool 4-diméthylthexylsilyloxy benzylique (39).

50 2,8 g (41,2 mmol) d'imidazole sont ajoutés à une solution d'alcool 4-hydroxybenzylique (2,55 g, 20,6 mmol) dans 25 ml de DMF anhydre. Le mélange est agité à température ambiante jusqu'à obtention d'une solution limpide, puis est refroidi à 0°C sous argon. On ajoute alors 4,4 ml (22,6 mmol) de chlorure de thexyldiméthylsilyle. Après 48 h d'agitation à 0°C, la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. On obtient 39 (3,7 g, 63 %) sous forme de gomme.

55 $C_{15}H_{26}O_2Si$, M = 266,44. I.R. ($CDCl_3$) : 3304 (OH), 2960 (CH) cm^{-1} . RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0,00 (s, 6H, CH_3Si), 0,83 (d, 6H, CH_3CCSi , J = 5 Hz), 0,83 (d, 6H, CH_3CSi), 1,50 (m, 1H, $CHCSi$), 4,50 (s, 2H, CH_2Ph), 6,67-7,03 (AB, Jgem = 6 Hz, 4H, Ph). SM (DIC) : m/z : 284 ($M+NH_4$) $^+$.

3) Carbonate de 2,5-diox pyrrolidin-1-yle et de 4-diméthylthexyl-silyloxybenzyle (40).

A une solution de DSC (1,39 g, 5 mmol) dans l'acétate d'éthyle anhydre (50 ml), on ajoute 1,85 g (10 mmol) de composé 35 et 0,8 ml de pyridine. Après 24 h d'agitation à la température ambiante, le mélange est filtré, et le filtrat concentré sous pression réduite, fournissant ainsi 40 (1,84 g, 91 %) sous forme d'une gomme.

$C_{20}H_{29}O_6SiN$, $M = 407,52$. I.R. ($CDCl_3$) : 2961 (CH), 1296 (CO) cm^{-1} .

RMN 1H (90 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 0,00 (s, 6H, CH_3Si), 0,80 (d, 6H, CH_3CCSi , $J = 5$ Hz), 0,80 (s, 6H, CH_3CSi), 1,50 (m, 1H, $CHCSi$), 2,73 (s, 4H, CH_2CO), 4,57 (s, 2H, CH_2Ph), 7,16 (AB, 4H, Ph, $J_{gem} = 6$ Hz). SM(DIC) : m/z : 425 ($M+NH_4$) $^+$.

4) N-[4-diméthylthexylsilyloxy-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (41).

A un mélange de 40 (29 mg, 0,073 mmol) et de daunomycine (20 mg, 0,043 mmol) dissous dans 0,4 ml de DMF anhydre, on ajoute 76 μ l (0,73 mmol) de Et_3N et, après 5 min d'agitation à la température ambiante, on effectue une extraction par de l'acétate d'éthyle. La solution obtenue est lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium, puis séchée sur Na_2SO_4 et concentrée sous pression réduite. On isole 41 (24 mg, 70 %) sous forme d'un sirop rouge.

$C_{43}H_{52}SiN$, $M = 819$. $[\alpha]_D^{20} = +53^\circ$ (c 0,03, $CHCl_3$). I.R. ($CDCl_3$) : 3597-3433 (OH), 2960 (CH), 1762 (CO) cm^{-1} . RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 0,00 (m, 6H, CH_3Si), 0,82 (d, 6H, $J = 5$ Hz), 0,82 (s, 6H), 1,27 (d, 3H, $J = 6$ Hz), 1,62 (m, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,89 et 3,20 (AB, 2H, $J = 6$ Hz), 3,93 (s, 1H), 4,04 (s, 3H), 4,20 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 4,62 (s, 2H), 5,52 (s, 1H), 5,33 (d, 1H, $J = 3$ Hz), 5,49 (dd, 1H, $J = 2$, $J' < 0,5$ Hz), 6,95 et 7,19 (AB, 4H, $J = 3$ Hz), 7,34 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7,78 (t, 1H, $J = J' = 9$ Hz), 8,00 (d, 1H, $J = 9$ Hz). SM (DIC) : m/z : 837 ($M+NH_4$) $^+$.

EXEMPLE 8 : synthèse de la N-[2-(α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (48b) et de la N-[2-(α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzyloxycarbonyl] doxorubicine (49b).

Selon le schéma VIII, la glycosidation catalysée par $SnCl_4$ du 5-nitro-o-crésol avec le peracétyl-D-galactose permet d'obtenir le dérivé 42.

La bromation benzylique, utilisant le NBS dans CCl_4 , permet d'obtenir un mélange de 43 et 44.

L'hydrolyse du dérivé dibromé 44 fournit l'aldéhyde 45 qui peut être réduit par le $NaBH_4$ en dérivé 46, tandis que l'hydrolyse du dérivé 43 conduit à un mélange de 45 et 46. Le formiate de 4-nitrophényle est utilisé pour activer le dérivé 46 et le couplage de 47 avec la daunorubicine et la doxorubicine conduit respectivement aux dérivés 48a et 49a.

1) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-méthyl 4-nitro phényle (42).

On additionne lentement $SnCl_4$ (0,6 ml) à une solution maintenue à température ambiante de 2-méthyl 4-nitrophénol (Réf. : J.S. ANDERSON et K.C. BROWN, Synthetic Commun., 13, 233-236, 1983) et de 1,2,3,4,6-penta-O-acétyl- β -D-galactose (1 g, 2,56 mmol). Le mélange réactionnel est alors agité sous azote pendant 12 heures à 60°C. Après hydrolyse dans l'eau glacée, une extraction avec CH_2Cl_2 , suivie d'un lavage avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis à l'eau, fournit 42 qui est alors purifié par chromatographie sur gel de silice (Rdt : 45 %).

$C_{21}H_{25}NO_{12}$, $M = 483$. $F = 166^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} = +184^\circ$ (c 0,56, $CHCl_3$). I.R. ($CHCl_3$) : 3030, 2960, 2925, 2860, 1745, 1580, 1520, 1490, 1370, 1345, 1220 cm^{-1} . RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,96 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 4,13 (m, 2H), 4,28 (m, 1H), 5,85 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 8,10 (s, 1H et d, $J = 9$ Hz, 1H).

2) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-bromométhyl-4-nitro phényle (43).

- Préparation :

à partir de 42, en utilisant NBS (1,5 éq.) - CCl_4 (cf. préparation des composés 2 et 9, exemple 1, Rdt : 51 %).

- Composé 43 : $C_{21}H_{24}BrNO_{12}$, $M = 562$. RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,96 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 4,13 (m, 2H), 4,32 (t, $J = 6$ Hz, 1H), 4,59 (AB q, $J = 9$ Hz, 2H), 5,38 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H), 5,5-5,8 (m, 2H), 5,99 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 7,28 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 8,20 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 8,29 (s, 1H).

3) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-diéromométhyl 4-nitr phényl (44).

- Préparations :

a) à partir de 42 en utilisant NBS (1,5 éq.) - CCl_4 (Rdt : 27 %) :b) à partir de 42 en utilisant NBS (4 éq.) - CCl_4 (Rdt : 60-90 %).

- Composé 44 : $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{NO}_{12}$, $M = 641$. $F = 70^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +143^\circ$ (c 0,47, CHCl_3). I.R. (CHCl_3) : 3030, 3020, 2960, 2930, 2860, 1745, 1620, 1590, 1525, 1480, 1415, 1370, 1345, 1220, 1130, 1110, 1075, 1040 cm^{-1} . RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,97 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 4,13 (m, 2H), 4,31 (t, J = 6 Hz, 1H), 5,3-5,7 (m, 3H), 5,93 (d, J = 14 Hz, 1H), 7,01 (s, 1H), 7,23 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,20 (d, J = 9 Hz), 8,75 (s, 1H).

4) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-formyl-4-nitro phényle (45).

- Préparations :

a) à partir de 43, en utilisant AgNO_3 (Rdt 15 %) :b) à partir de 44, en utilisant AgNO_3 (Rdt 83 %).

- Composé 45 : $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_{13}$, $M = 497$. $F = 180^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +97^\circ$ (c 2, CHCl_3). I.R. (CHCl_3) : 3030, 2960, 2930, 2880, 2860, 1745, 1695, 1645, 1610, 1590, 1530, 1480, 1430, 1370, 1345, 1220, 1180, 1125, 1110, 1075, 1045 cm^{-1} . RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,98 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 4,13 (m, 2H), 4,35 (t, J = 6 Hz, 1H), 5,3-5,6 (m, 3H), 5,99 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,41 (dd, J = 9 et 2 Hz, 1H), 10,52 (s, 1H).

5) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -galactopyranoside de (2-hydroxyméthyl-4-nitro) phényle (46).

- Préparations :

a) à partir de 43, en utilisant AgNO_3 (Rdt 19 %) (cf. préparation de 11 et 18) :b) à partir de 45, en utilisant NaBH_4 -THF-MeOH (Rdt : 73 %).

- Composé 46 : $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}$, $M = 499$. $F = 140^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +152^\circ$ (c 0,42, CDCl_3). I.R. (CDCl_3) : 3700, 3600, 3030, 2970, 2940, 2860, 1750, 1630, 1625, 1595, 1585, 1370, 1350, 1210, 1130, 1110, 1075, 1035 cm^{-1} . RMN ^1H (200 MHz, CHCl_3) δ ppm : 1,97 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 4,12 (m, 3H), 4,33 (t, J = 6 Hz, 1H), 4,71 (d, J = 14 Hz, 1H), 4,89 (d, J = 14 Hz, 1H), 5,35-5,6 (m, 3H), 5,87 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,19 (dd, J = 9 et 2 Hz, 1H), 8,32 (d, J = 2 Hz, 1H).

6) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzyle (47).

- Préparation :

à partir de 46 et du chloroformate de p-nitrophényle (Rdt : 52 %).

- Composé 47 : $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{17}$, $M = 664$. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,93 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 4,12 (m, 2H), 4,30 (t, J = 6 Hz, 1H), 5,3-5,6 (m, 5H), 5,93 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 9 Hz, 1H), 8,2-8,4 (m, 4H).

7) N-[2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] daunorubicine (48a).

- Préparation :

à partir de 47 et de la daunorubicine (cf préparation de 6, exemple 1, Rdt : 31 %).

- Composé 48 : $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{24}$, $M = 1052$. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,86 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,94 (d, J = 20 Hz, 1H), 3,23 (d, J = 20 Hz, 1H), 3,60 (s, 1H), 4,08 (s, 3H), 5,02 (d, J = 12 Hz, 1H), 5,21 (d, J = 12 Hz, 1H), 5,3-5,8 (m, H), 5,93 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,18 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,80 (t, J = 8 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,17 (dd, J = 9 et 2 Hz, 1H), 8,26 (s large, 1H), 13,30 (s, 1H) et 13,99 (s, 1H).

8) N-[2-(α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] daunorubicine (48b).

- Préparation :

à partir de 48a, en utilisant MeONa (cat.)-MeOH (Rdt : 83 %).

- Composé 48b : Amorphe. $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{20}$, $M = 88,4$ $F = 140^\circ\text{C}$ (dec.).

9) N-[2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzyloxy carbonyl] doxorubicine (49a).

- Préparation :

à partir de 47 et de la doxorubicine. Rdt : 13 %

- Composé 49a : $C_{49}H_{52}N_2O_{25}$, M = 1068. RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,86 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,99 (s, 1H), 3,03 (d, J = 20 Hz, 1H), 3,29 (d, J = 20 Hz, 1H), 4,10 (s, 3H), 4,59 (s, 1H), 4,74 (s, 1H), 5,07 (d, J = 12 Hz, 1H), 5,22 (d, J = 12 Hz, 1H), 5,3-5,8 (m, H), 5,95 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,80 (t, J = 8 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,18 (dd, J = 9 et 2 Hz, 1H), 8,27 (s large, 1H), 13,28 (s, 1H), 14,0 (s, 1H).

10) N-[2-(α -D-galactopyranosyl)-5-nitro-benzyloxycarbonyl] doxorubicine (49b).

Par traitement de 49a avec MeONa-MeOH (cf préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2). Solide rouge $C_{41}H_{44}N_2O_{21}$, M = 900.

EXEMPLE 9 : synthèse de la N-[2-((β -D-glucopyranosyl) acide uronique)-5-nitro-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (54c).

Selon le schéma IX, le bromure de peracétyl- β -D-glucopyranoside uronate du méthyle est condensé avec le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde en présence d' Ag_2O à température ambiante. Le glycoside 51 (Rdt = 46 %) est converti en dérivé 52 ($NaBH_4$ -THF, MeOH, rdt = 70 %) et le dérivé activé de 52, i.e. 53 (rdt = 73 %) réagit avec la daunorubicine pour fournir le dérivé 54a (rdt = 62 %).

1) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-formyl 4-nitro phényle) uronate de méthyle (51).

- Préparation :

Une solution de bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside uronate de méthyle (1,45 g, 3,64 mmol) et de 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (609 mg = 3,64 mmol) dans 22 ml d'acétonitrile contenant de l'oxyde d'argent (1,3 g, 5,6 mmol) est agitée 4 heures à température ambiante. Après filtration du milieu réactionnel et évaporation du filtrat, une chromatographie "flash" permet d'obtenir 800 mg de 51 (Rdt : 46 %).

- Composé 51 : $C_{26}H_{21}NO_{13}$, M = 483. F = 173-174°C. $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ (c 1, $CHCl_3$) ; I.R. (CH_2Cl_2) : 3060, 2960, 1755, 1690, 1590, 1530 cm^{-1} ; RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,09 (s, 9H), 3,73 (s, 3H), 4,40 (d, H-5, J = 8,5 Hz), 5,5 (m, 4H), 7,32 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 8,42 (dd, 1H, J = 9,1 et 3 Hz), 8,67 (d, 1H, J = 3 Hz), 10,31 (s, 1H).

2) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-hydroxy méthyl 4-nitro-phényle) uronate de méthyle (52)

- Préparation :

A partir de 51, en utilisant $NaBH_4$ -THF-MeOH (Rdt = 70 %).

- Composé 52 : $C_{26}H_{23}NO_{13}$, M = 485. F = 137-145°C. $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ (c 0,7, $CHCl_3$) ; I.R. (CH_2Cl_2) : 3600, 3570, 3060, 2960, 1755, 1620, 1590 1525, 1485, 1435, 1370, 1340, 1230, 1075, 1040, 900 cm^{-1} ; RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,07 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,95 (OH), 3,72 (s, 3H), 4,30 (d, H-5, J = 8,7 Hz), 4,61 et 4,72 (ABq, 2H, J = 13,8 Hz), 5,32 (m, 4H), 7,08 (d, 1H, J = 9 Hz), 8,12 (dd, 1H, J = 9 et J = 2,7 Hz), 8,27 (d, 1H, J = 2,7 Hz). SM (FAB $^+$) m/z : 508 (M+Na) $^+$.

3) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitro-benzyle (53).

- Préparation :

A partir de 52 et de chloroformiate de paranitrophényle (Rdt : 73 %).

- Composé 53 : $C_{27}H_{25}N_2O_{16}$, M = 634. F = 154-155°C. $[\alpha]_D^{20} = -34,5^\circ$ (c 1, $CHCl_3$) ; I.R. (CH_2Cl_2) : 2960, 2880, 1760, 1620, 1595, 1525, 1490, 1370, 1345, 1230, 1215, 1080, 1040, 860 cm^{-1} ; RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,08 et 2,09 (2s, 9H), 3,74 (s, 3H), 4,36 (d large, 1H, J = 8,7 Hz), 5,36 (m, 6H), 7,23 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,43 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 8,26 (m, 4H).

4) N-[2-((2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] daunorubicine (54a).

- Préparation :

5 A partir de 53 et de daunorubicine (Rdt 62 %).

- Composé 54a : $C_{48}H_{50}O_{24}N_2$, M = 1038, F = 142-145°C. $[\alpha]_D^{20} = +115^\circ$ (c 0,6, $CHCl_3$) ; I.R. (CH_2Cl_2) : 2950, 1755, 1720, 1710, 1620, 1580, 1525, 1345, 1230, 1210, 1110, 1080, 1035 cm^{-1} ; RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,32 (d, 3H, J = 7,3 Hz), 2,09 et 2,11 (2s, 9H), 2,43 (s, 3H), 2,93 et 3,24 (ABq, 2H, J = 19 Hz), 3,59 (s, 3H), 4,30 (m, 2H), 4,51 (s, 1H), 4,96 et 5,11 (ABq, 2H, J = 13 Hz), 5,20 et 5,60 (m, 6H), 7,14 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,41 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,79 (t, 1H, J = 8 Hz), 8,05 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,21 (2H), 12,15 (s, 1H), 12,91 (s, 1H).

5) N-[2-((β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] daunorubicine (54b).

15 A partir de 54a avec MeONa-MeOH (cf. préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2). Solide rouge. $C_{42}H_{44}N_2O_{21}$, M = 912. RMN (CD_3COCD_3) : δ ppm : 2,37 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 4,04 (s, 3H), 6,50 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,89 (m, 2H), 8,19 (m, 2H), 13,30 (s, 1H), 14,15 (s, 1H).

6) N-[2-((β-D-glucopyranosyl) acide uronique)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] daunorubicine (54c).

20 A partir de 54b et de BaO (cf. préparation de 22 dans l'exemple 3). Solide rouge. $C_{41}H_{42}N_2O_{21}$, M = 898.

EXEMPLE 10 : Synthèse de N-[2-((β-D-glucopyranosyl) acide uronique)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] doxorubicine (80c).

25

1) Synthèse de N-[2-((2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] doxorubicine (83a).

- Préparation :

30 A partir de 53 et de doxorubicine (65 %).

- Composé 83a : $C_{48}H_{50}N_2O_{25}$, M = 1054 ; F = 162-167°C (dec) ; $[\alpha]_D^{20} 122^\circ$ (c 0,5, $CHCl_3$) ; IR (CH_2Cl_2) : 1757, 1720, 1618, 1580, 1525, 1410, 1370, 1344, 1230 cm^{-1} ; RMN (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 1,30 (d, 3H, J = 7,3 Hz), 2,06 et 2,08 (2s, 9H), 2,94 et 3,23 (ABq, 2H, J = 19 Hz), 3,60 (s, 3H), 4,06 (s, 3H), 4,28 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,03 (ABq, 2H, J = 13 Hz), 5,27-5,51 (m, 6H), 7,11 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,99 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,15 (m, 2H), 12,62 (s, 1H), 13,15 (s, 1H).

35

2) Synthèse de N-[2-((β-D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] doxorubicine (83b).

40 - Préparation :

A partir de 83a avec MeONa-MeOH (cf. préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2).

- Composé 83b : $C_{42}H_{44}N_2O_{22}$, M = 928 ; F = 180°C (dec.) ; $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (c 0,5, $CHCl_3$) ; RMN (200 MHz, CD_3COCD_3) : δ ppm : 1,29 (d, 3H, J = 7,3 Hz), 3,79 (s, 3H), 4,07 (s, 3H), 6,09 (d, NH), 7,12 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 7,41 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,79 (t, 1H, J = 8 Hz), 8,00 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,16 (m, 2H), 12,75 (s, 1H), 13,25 (s, 1H).

45

3) Synthèse de N-[2-((β-D-glucopyranosyl) acide uronique)-5-nitro-benzoyloxycarbonyl] doxorubicine (83c).

- Préparation :

50 A partir de 83b avec NaOH ou l'estérase de foie de porc (EC 3.1.1.1.).

- Composé 83c : solide rouge ; $C_{41}H_{42}N_2O_{22}$; M = 914.

EXEMPLE 11 :

55 1) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-galactopyranoside de 2-chloro-4-méthyl phényle (55).

- Préparation :

A partir du 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-galactopyranose et du 2-chloro-4-méthylphénol (cf. préparation

de 1, Rdt = 40 %).

- Composé 55 : $C_{21}H_{25}O_{10}Cl$. M = 472,5. RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 2,02 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 4,12 (dd, 1H, J = 12, J' = 7 Hz), 4,17 (dd, 1H, J = 12, J' = 6 Hz), 4,54 (ddd, 1H, J = 7, J' = 6, J'' = 1 Hz), 5,29 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,61 (m, 1H), 5,63 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,76 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,02 (dd, 1H, J = 8, J' = 2 Hz), 7,07 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,23 (d, 1H, J = 2 Hz). SM (DIC/ NH_3) : m/z 490 ($M+NH_4$)⁺, 456, 331.

2) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-chloro-4-bromométhyl phényle (56).

- Préparation :

Monobromation à partir de 55 avec activation photochimique (cf. préparation de 2, Rdt = 80 %).

- Composé 56 : $C_{21}H_{24}O_{10}ClBr$. M = 551,5. RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 2,00 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 4,09 (dd, 1H, J = 12, J' = 7 Hz), 4,14 (dd, 1H, J = 12, J' = 6 Hz), 4,42 (s, 2H), 4,50 (ddd, 1H, J = 7, J' = 6, J'' = 1 Hz), 5,27 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,58 (m, 1H), 5,60 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,80 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,13 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,22 (dd, 1H, J = 8, J' = 2 Hz), 7,42 (d, 1H, J = 2 Hz). SM (DIC/ NH_3) : m/z 571 ($M+NH_4$)⁺, 569 ($M+NH_4$)⁺, 490, 331.

3) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-chloro-4-hydroxyméthyl phényle (57).

- Préparation :

A partir de 56 (cf. préparation de 4, Rdt = 34 %).

- Composé 57 : $C_{21}H_{25}O_{11}Cl$. M = 488,5. RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 1,98 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 4,09 (dd, 1H, J = 12, J' = 7 Hz), 4,14 (dd, 1H, J = 12, J' = 6 Hz), 4,49 (ddd, 1H, J = 7, J' = 6, J'' = 1 Hz), 4,64 (s, 2H), 5,26 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,58 (m, 1H), 5,60 (dd, 1H, J = 10, J' = 4 Hz), 5,77 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,15 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,20 (dd, 1H, J = 8, J' = 2 Hz), 7,42 (d, 1H, J = 2 Hz). SM (DIC/ NH_3) : m/z 506 ($M+NH_4$)⁺, 472, 331.

4) Carbonate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yle et de 3-chloro-4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-benzyle (58).

- Préparation :

A partir de 57 et de disuccinimidocarbonate (DSC) (cf. préparation de 19, exemple 3).

Remarquons que du fait de son instabilité, le composé 58 n'a pu être purifié et isolé sur colonne de silice.

- Composé 58 : $C_{28}H_{28}ClNO_{16}$. M = 629,5.

5) N-[3-chloro-4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (59).

- Préparation :

Couplage de 58 avec la daunorubicine (cf. préparation de 6, Rdt = 20 %).

- Composé 59 : $C_{49}H_{52}ClNO_{22}$. M = 1 041,5. RMN 1H (270 MHz, DMSO) : δ ppm : 1,12 (d, 3H, J = 7 Hz), 1,48 (m, 1H), 1,88 (m, 2H), 1,98 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,23 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,76 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 3,50-4,20 (m, 5H), 4,00 (s, 3H), 4,44 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 4,90 (m, 3H), 5,20 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,43 (m, 2H), 5,53 (s, 1H), 5,85 (d, 1H, J = 4 Hz), 6,94 (m, 1H), 7,23 (m, 2H), 7,47 (d, 1H, J = 2 Hz), 7,66 (m, 1H), 7,92 (m, 2H). SM (DIC/ NH_3) : m/z 1060 ($M+NH_4$)⁺, 506, 331.

6) N-[3-chloro-4-(α -D-galactopyranosyl)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (60).

- Préparation :

A partir de 59 (cf. préparation de 7, Rdt = 91 %).

EXEMPLE 12 : Synthèse de N-[3-nitro-4-(β -D-glucopyranosyl) acide uronique]-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (64c).

1) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-formyl 2-nitro-phényle) uronate de méthyle (61).

- Préparation :

A partir d'une solution de bromure de (2,3,4-tri-O-acétyl-D-glucopyranoside) uronate de méthyle (5,3 g)

et de 3-nitro-p-hydroxybenzaldéhyde (3,55 g) et d'oxyde d'argent (15,45 g) dans les conditions indiquées pour préparer 51. Après chromatographie flash et cristallisation on obtient 5,35 g (80 %) d 61 pur.

- Composé 61 : $C_{20}H_{21}NO_{13}$, M = 483, F = 172-173°C : $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ (c 1, $CHCl_3$) ; IR (laque) : 1760, 1230 cm^{-1} ; RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,16 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 3,71 (s, 3H, OMe), 4,33 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 5,45-5,25 (m, 4H), 7,49 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 8,08 (dd, 1H, J = 7,5, J' = 1,8 Hz), 8,31 (dd, 1H, J = 1,8 Hz), 9,97 (s, 1H) ; SM (DIC/NH_3) : m/z 501 ($M+NH_4$) $^+$.

2) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-hydroxyméthyl-2-nitro phényle) uronate de méthyle (62).

- Préparation :

A partir de 61 en utilisant $NaBH_4$ -THF-MeOH (Rdt 72 %).

- Composé 62 : $C_{20}H_{23}NO_{13}$, M = 485, F = 173-174°C : $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ (c 1, $CHCl_3$) ; RMN 1H : δ ppm 2,08 (s, 6H), 2,01 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 4,12 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,62 (s, 2H), 5,35-5,02 (m, 4H), 7,21 (d, 1H, J = 7 Hz), 7,39 (dd, 1H, J = 7 Hz, J' = 1,8 Hz), 7,65 (d, 1H, J = 1,8 Hz). SM (DIC/NH_3) : m/z 503 ($M+NH_4$) $^+$.

3) N-[3-nitro-4-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (64a).

- Préparation :

A partir de 62 et de DSC on obtient intermédiairement le carbonate 63 qui n'est pas purifié mais immédiatement remis en réaction avec la daunorubicine selon les conditions décrites pour préparer 54.

On isole 64a avec 50 % de rendement.

- Composé 64a : $C_{48}H_{50}N_2O_{24}$, M = 1038, F = 137-138°C : $[\alpha]_D^{20} +88^\circ$ (c 0,5, chloroforme) ; IR ($CDCl_3$) : 1760, 1720, 1220 cm^{-1} ; RMN 1H δ ppm 1,30 (d, 3H, J = 6Hz), 1,75 (m, 2H), 2,12 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,45 (s, 3H), 3,00 (d, 1H, J = 20 Hz), 3,30 (d, 1H, J = 20 Hz), 3,75 (s, 3H), 4,14 (s, 3H), 4,26 (m, 2H), 4,47 (s, 1H), 5,08 (s, 2H), 5,10-5,47 (m, 4H), 5,58 (d, 1H), 7,50 (1H), 7,89 (1H), 8,05 (1H), 14,00 (s, 1H), 13,30 (s, 1H).

4) β -D-glucopyranoside de N-(4-hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl) daunorubicine (64b).

A partir de 64a avec MeOH-MeONa (cf. préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2). Solide rouge. $C_{42}H_{44}N_2O_{21}$, M = 912.

5) β -D-glucuronide de N-(4-hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl) daunorubicine (64c).

A partir de 64b et de BaO ou K_2CO_3 (cf. préparation de 22 dans l'exemple 3). Solide rouge. $C_{41}H_{42}N_2O_{21}$, M = 898.

EXEMPLE 13 : Synthèse du N-[4-méthoxy-5-nitro-2((β -D-glucopyranosyl) acide uronique)-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (68c).

Conformément au schéma XII, la glycosidation catalysée par Ag_2O du 2-hydroxy-4-méthoxy-5-nitrobenzaldéhyde avec le bromure de peracétyl- β -D-glucopyranoside uronate de méthyle permet d'obtenir le composé 65 qui est ensuite converti, selon le procédé décrit dans l'exemple 9, en dérivé 68c.

1) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-formyl-5-méthoxy-4-nitro-phényl) uronate de méthyle (65).

Il est obtenu avec un rendement de 53 % selon le procédé utilisé pour 51 (voir exemple 9).

- Composé 65 : $C_{21}H_{23}NO_{14}$, M = 513, F : 159°C, $[\alpha]_D -83^\circ$ (c 0,95, $CHCl_3$). IR ($CHCl_3$) : 3080, 3010, 1765, 1695, 1620, 1580, 1540, 1450, 1375, 1300, 1220, 1080, 1045 cm^{-1} . RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 2,08 (s, 6H), 2,10 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 4,04 (s, 3H), 4,39 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,39 (m, 4H), 6,92 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 10,16 (s, 1H).

2) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-hydroxyméthyl-5-méthoxy-4-nitro-phényle) uronate de méthyle (66).

Préparation à partir de 65 en utilisant NaBH_4 -THF-MeOH (Rdt. 30 %).

5 - Composé 66 : $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_{14}$, M = 514, F : 176°C. $[\alpha]_D^{20}$ -61° (c 1.05, CHCl_3). IR (CHCl_3) : 3560, 3040, 2960, 1760, 1625, 1590, 1530, 1445, 1375, 1350, 1290, 1220, 1075, 1040 cm^{-1} . RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm : 2,07 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 4,27 (1H), 4,50 et 4,63 (qAB, 2H, J = 12,9 Hz), 5,23 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 7,99 (s, 1H).

10 3) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 4-méthoxy-5-nitro-2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyle (67).

Préparation à partir de 66 et de chloroformiate de 4-nitro-phényle (Rdt. 74 %).

15 - Composé 67 : $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{18}$, M = 680, F : 90°C. $[\alpha]_D^{20}$ -47° (c 1.05, CHCl_3). IR (CHCl_3) : 3020, 2960, 1745, 1615, 1575, 1435, 1340, 1280, 1205, 1068, 1030, 895, 852 cm^{-1} . RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm : 2,06 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 4,35 (1H), 5,14 et 5,24 (qAB, 2H, J = 12 Hz), 5,39 (m, 4H), 6,92 (s, 1H), 7,43 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 8,09 (s, 1H), 8,30 (d, 2H, J = 9,1 Hz).

20 4) N-[4-méthoxy-5-nitro-2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyloxycarbonyl] daunorubine (68a).

Préparation à partir de 67 et de daunorubine (Rdt. 83 %).

25 - Composé 68a : $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{25}$, M = 1068, F : 153°C (dec.). $[\alpha]_D^{20}$ +105° (c 0,24, CHCl_3). RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm : 1,31 (d, 3H, J = 7 Hz), 2,07 et 2,12 (2s, 9H), 2,42 (s, 3H), 2,91 et 3,24 (qAB, 2H, J = 18,7 Hz), 3,62 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 4,08 (s, 3H), 4,93 (qAB, 2H), 5,88 (s, 1H), 7,39 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,77 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,94 (s, 1H), 8,03 (d, 1H, J = 6 Hz), 9,59 (s, 1H), 10,29 (s, 1H).

30 5) N-[4-méthoxy-5-nitro-2-((β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyloxycarbonyl] daunorubine (68b).

Préparation à partir de 68a (Rdt. 91 %) en utilisant MeONa -MeOH (-20°C, 12 heures).

35 - Composé 68b : $\text{C}_{43}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{22}$, M = 942, F : 176-177°C. $[\alpha]_D^{20}$ +1° (c 0,19, CHCl_3). IR (CHCl_3) : 3000, 1750, 1720, 1710, 1620, 1580, 1520, 1440, 1410, 1365, 1345, 1280. RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) : δ ppm : 2,43 (s, 3H), 3,10 (qAB, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 4,08 (s, 3H), 6,28 (d, 1H), 6,87 (s, 1H), 7,46 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,83 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,02 (m, 2H). SM (FAB⁺) m/z : 1092.

6) N-[4-méthoxy-5-nitro-2-((β -D-glucopyranosyl) acide uronique)-benzyloxycarbonyl] daunorubine (68c).

40 Préparation à partir de 68b en utilisant Na_2CO_3 -MeOH- H_2O .

- Composé 68c : solide rouge. $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{22}$ M = 928.

EXEMPLE 14 : Synthèse du N-[2-((β -D-glucopyranosyl) acide uronique)-5-chloro-benzyloxycarbonyl] daunorubine (82c).

45 1) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-formyl-4-chlorophényle) uronate de méthyle (79).

- Ce composé est obtenu avec un rendement de 41 % selon le procédé utilisé pour 51 (voir exemple 9).

50 - Composé 79 : $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClO}_{11}$, M = 472,5 ; F = 156-157°C ; $[\alpha]_D^{20}$ -39° (c 1, CHCl_3) ; IR (CH_2Cl_2) : 2940, 2870, 1755, 1680, 1585, 1465 cm^{-1} ; RMN (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm : 2,09 (s, 9H), 3,74 (s, 3H), 4,25 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 5,30 (m, 4H), 7,10 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,53 (dd, 1H, J = 8,5 et 2,5 Hz), 7,80 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 10,27 (s, 1H) ppm.

55 2) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-hydroxyméthyl-4-chlorophényle) uronate de méthyle (80).

- Préparation à partir de 79, en utilisant NaBH_4 -THF-MeOH (70 %).

- Composé 80 : $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClO}_{11}$, M = 474,5 ; F = 120°C ; $[\alpha]_D^{20}$ -20° (c 0,9, CHCl_3) ; IR (CH_2Cl_2) : 3050, 2980,

1750, 1470, 1415, 1250, 1220 cm^{-1} ; RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 2,06 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 4,14 (d, 1H, J = 9 Hz), 4,3 t 4,72 (ABq, 2H, J = 13 Hz), 5,11 (d, 1H, J = 6,5 Hz), 5,34 (m, 3H), 6,94 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,23 (dd, 1H, J = 8,7 et 2,5 Hz), 7,36 (d, 1H, J = 2,5 Hz) ppm.

5 3) Carbonate de 4-chlorophényle et de 2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitrobenzyle (81).

- Préparation à partir de 80 et de chloroformiate de 4-nitrophényle (50 %).

10 - Composé 81: $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClNO}_{14}$; M = 623,5; F = 136°C; RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 2,08 (s, 9H), 3,74 (s, 3H), 4,22 (d large, 1H, J = 8,7 Hz), 5,30 (m, 6H), 7,03 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,30 (m, 4H), 8,30 (d, 2H, J = 8,3 Hz) ppm.

4) N-[2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-chloro-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (82a).

15 - Préparation à partir de 81 et de daunorubicine (73 %).

20 - Composé 82a: $\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{ClNO}_{22}$; M = 1027,5; F = 155°C (dec.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 125° (c 0,24, CHCl_3); IR (CH_2Cl_2): 1755, 1715, 1610, 1575 cm^{-1} ; RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 1,31 (d, 3H, J = 7 Hz), 2,05 (s, 6H), 2,08 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,94 et 3,25 (ABq, 2H, J = 19 Hz), 3,62 (s, 3H), 4,06 (s, 3H), 4,20 (m, 2H), 4,53 (s large, 1H), 4,96 (s large, 2H), 5,15-5,52 (m, 6H), 7,00 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,20 (m, 2H), 7,40 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,79 (t, 1H, J = 8 Hz), 8,05 (d, 1H, J = 8 Hz) ppm.

5) N-[2-((β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-chloro-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (82b).

25 - Préparation à partir de 82a avec MeONa-MeOH (voir préparation de 7 et 14, exemples 1 et 2), avec un rendement de 47 %.

30 - Composé 82b: solide rouge; $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{ClNO}_{19}$; M = 901,5; F = 167-170°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 0° (c 0,03, MeOH); RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 2,42 (s, 3H), 2,96 et 3,23 (ABq, 2H, J = 18 Hz), 3,79 (s, 3H), 4,07 (s, 3H), 5,89 (d, NH), 6,99 (d large, 1H, J = 8 Hz), 7,20 (d large, 1H, J = 8 Hz), 7,33 (s, 1H), 7,41 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,80 (t, 1H, J = 8 Hz), 8,03 (d, 1H, J = 8 Hz) ppm.

6) N-[2-((β -D-glucopyranosyl) acide uronique)-5-chloro-benzyloxycarbonyl] daunorubicine (82c).

35 - Préparation à partir de 82b et de Na_2CO_3 (voir préparation de 22, exemple 3).

- Composé 82c: solide rouge; $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{ClNO}_{19}$; M = 887,5.

EXEMPLE 15: Synthèse du β -D-glucuronide de N-[4-hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl] doxorubicine (70c).

40 1) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 4-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -glucopyranosyl) uronate de méthyle-5-nitrobenzyle (69).

- Préparation à partir de 62 et de chloroformiate de paranitrophényle (Rdt: 47 %).

45 - Composé 69: $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{17}$; M = 650; F = 126°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +12° (c 0,1, CHCl_3); IR (KBr) $_{\text{vmax}}$ 1730 (CO, ester), 1210; RMN ^1H (90 MHz, CDCl_3): δ ppm 7,81 (d, 1H, J = 5 Hz), 7,54 (dd, 1H, J = 8,4 Hz), 7,30 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 5,36-5,29 (m, 3H), 5,18 (d, 1H, J = 6,7 Hz), 4,72 (s, 2H), 4,20 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 3,74 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,05 (s, 3H). SM (DCI/NH_3) m/z: 668 (M+18) $^+$, 608, 503, 443.

50 2) N-[3-nitro-4-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyloxycarbonyl] doxorubicine (70a).

- Préparation à partir de 69 et de la doxorubicine (Rdt: 86 %).

55 - Composé 70a: $\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{O}_{25}\text{N}_2$; M = 1054; F = 114°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +121° (c 0,05, CHCl_3); IR (KBr) $_{\text{vmax}}$ 1760, 1730, 1220. RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ ppm 13,90 (s, 1H, OH phénol), 13,15 (s, 1H, OH phénol), 8,00-7,20 (m, 6H arom.), 5,47 (s, 1H), 5,29-5,16 (m, 5H), 4,97 (s, 2H), 4,73 (s, 2H), 4,20-4,15 (m, 2H), 4,21 (s, 3H), 3,80 (s, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,68 (s, 1H), 3,19 (d, 1H, J = 19 Hz) et 2,91 (d, 1H, J = 19 Hz), 2,30 (d, 1H, J = 13,6 Hz), 2,15 (s, 3H), 2,10 (d, 1H, J = 13,6 Hz), 2,07 (s, 6H), 1,83 (br s, 2H), 1,27 (d, 1H, J = 5,4 Hz).

3) N-[3-nitro-4-(β -D-glucopyranosyl) ur nate de méthyle]benzyloxycarbonyl] doxorubicin (70b).

- Préparation à partir de 70a (1,48 g) dissous dans du DMF anhydre (20 mL) auquel on ajoute 200 mL de MeOH anhydre puis, après refroidissement à 0°C, 18 mL de MeONa 1M. On laisse agiter durant 1 h à 0°C et neutralise par une solution méthanolique d'AcOH (10 %) en laissant à 0°C. Après évaporation à sec et chromatographie flash (solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10), on isole 500 mg de 70b pur.

- Composé 70b : $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{O}_{22}\text{N}_2$; M = 928 ; F = 150°C ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +85^\circ$ (c 0,05, THF) ; RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) : δ ppm 13,92 (s, 1H), 13,22 (s, 1H), 7,92-7,18 (m, 6H), 5,23 (s, 1H), 5,07 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,88 (s, 1H), 4,57 (s, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 3,01 (d, 1H) et 2,85 (d, 1H, J = 18 Hz) (AB syst), 2,22 (d, 1H, J = 13,6 Hz), 2,03 (dd, 1H, J = 13,6, J' = 5 Hz), 1,92-1,37 (m, 4H), 1,15 (d, 1H, J = 6,8 Hz). SM (FAB) m/e : 951 (M+23).

4) β -D-glucuronide de N-[4-hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl] doxorubicine (70c).

- Préparation : le composé 70b (780 mg) est dissous dans le THF (75 mL), puis l'on ajoute de l'eau (\approx 30 mL) et de la soude 2N (goutte à goutte) (750 μL), après refroidissement à 0°C. Après agitation à 0°C durant 1 h 30, on neutralise par addition de résine IR 50H⁺. Le filtrat est alors évaporé jusqu'à un volume d'environ 35 mL, puis lyophilisé. On obtient 750 mg de 70c pur.

- Composé 70c : $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{O}_{22}\text{N}_2$; M = 914 ; F = 210°C ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -78^\circ$ (c 0,05, H_2O). RMN ^1H (250 MHz, DMSO) : δ ppm 14,00 (l s, 2H), 8,00-6,90 (m, 6H), 5,48 (s, 1H), 5,23 (s, 1H), 5,07 (d, J = 6,4 Hz), 4,98 (m, 2H), 4,59 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,30-3,10 (m, 2H), 2,96 (d, 1H, J = 14 Hz), 2,91 (d, 1H, J = 14 Hz), 2,20 (d, 1H, J = 11,5 Hz), 2,13 (d, 1H, J = 11,5 Hz), 1,87 (d, 1H, J = 13 Hz), 1,48 (d, 1H, J = 13 Hz), 1,13 (d, 3H, J = 6,4 Hz).

25 EXEMPLE 16 : Synthèse de α -D-galactopyranoside de N-4-hydroxy-3-nitro-(benzyloxycarbonyl) daunorubicine (75b).1) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-méthylphényle (71).

Un mélange de penta-O-acétyl-D-galactopyranose (36 g, 92 mmoles), de p-crésol (30 g, 280 mmoles) et de chlorure de zinc anhydre (1,8 g) est porté à 160°C pendant 30 minutes, selon la technique d'Helferich. Après refroidissement, le mélange, directement chromatographié sur gel de silice 60H (hexane-acétate d'éthyle : 90/10-v/v) fournit le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-méthylphényle (15 g, 40 %), qui cristallise dans l'éthanol. Ses caractéristiques analytiques sont identiques à celles décrites précédemment.

2) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-bromométhylphényle (72).

- Préparation : une solution de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-méthylphényle (71) (1,4 g, 3,2 mmoles) et de 1,3-dibromo 5,5-diméthylhydantoïne (0,46 g, 1,6 mmole) dans 100 mL de tétrachlorure de carbone, est portée à reflux et irradiée (1 000 W) pendant 15 minutes. Après refroidissement, filtration et évaporation à sec, le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-bromométhylphényle (72) est isolé par cristallisation dans le méthanol (3,5 g, 76 %).

- Composé 72 : $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_{10}\text{Br}$, M = 517 ; F = 105°C (MeOH) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +168^\circ$ (c 1, CHCl_3) ; IR (KBr) cm^{-1} : 1747 (vC = O ester), 1222 (v CH_2Br) ; RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,97 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 4,05 (dd, J = 11 et 7 Hz, 1H), 4,13 (dd, J = 11 et 6 Hz, 1H), 4,18 (t, J = 7 Hz, 1H), 4,52 (s, 2H), 5,28 (dd, J = 11 et 4 Hz, 1H), 5,52 (d, J = 3 Hz, 1H), 5,58 (dd, J = 11 et 3 Hz, 1H), 5,79 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 9 Hz, 2H). SM (DIC/ NH_3) m/z : 534/536 (M+ NH_4)⁺.

3) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-bromométhyl 2-nitro)-phényle (73).

- Préparation : à une solution de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-bromométhylphényle (72) (1,5 g, 2,9 mmoles) dans 10 mL d'anhydride acétique, sont ajoutées goutte à goutte, en 2 heures, à 20°C, 5 mL d'acide nitrique fumant. Après une heure d'agitation, le milieu est neutralisé par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. Après extraction usuelle, une chromatographie sur gel de silice 60H permet d'isoler le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-bromométhyl-2-nitro)-phényle (73) (1,12 g, 69 %).

- Composé 73 : $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_{12}\text{Br}$; M = 562 ; F = 168°C (MeOH) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +165^\circ$ (c 1,01, CHCl_3) ; IR (KBr) cm^{-1} : 1747 (vCO ester), 1534 (vasNO), 1222 (v CH_2Br) ; RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm : 1,84 (s, 3H), 1,88 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 4,11 (d, J = 7 Hz, 2H), 4,39 (t, J = 7 Hz, 1H), 4,47 (s, 2H), 5,24 (dd, J = 11 et 4

Hz, 1H), 5,48 (dd, J = 11 et 3 Hz, 1H), 5,57 (d, J = 3 Hz, 1H), 5,89 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,56 (dd, J = 9 et 2 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 2 Hz, 1H). SM (DIC/NH₃) m/z : 579/581 (M+NH₄)⁺.

4) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-hydroxyméthyl 2-nitro)-phényle (74).

5

- Préparation : une solution de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-bromométhyl 2-nitro)-phényle (73) (0,3 g, 0,5 mmole) dans 15 ml d'acétone, additionnée de 15 ml d'une solution aqueuse de nitrate d'argent 0,1 N est agitée à 20°C, durant une nuit. Après filtration puis évaporation de l'acétone, le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-hydroxyméthyl 2-nitro)-phényle (74) précipite dans l'eau. Ce dernier est recueilli puis séché (0,25 g, 93 %).

10

- Composé 74 : C₂₁H₂₅NO₁₃ ; M = 499 ; F = 170°C (MeOH) ; [α]_D²⁰ = +174° (c 1,02, CHCl₃) ; IR (KBr) cm⁻¹ : 3500 (νOH), 1746 (νC = O ester), 1234 (νC-OH) ; RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm : 2,00 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 4,13 (d, J = 6 Hz, 2H), 4,43 (t, J = 6 Hz, 1H), 4,73 (d, J = 5 Hz, 2H), 5,27 (dd, J = 11 et 4 Hz, 1H), 5,50 (dd, J = 11 et 3 Hz, 1H), 5,59 (d, J = 3 Hz, 1H), 5,88 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,53 (dd, J = 9 et 2 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 2 Hz, 1H). SM (DIC/NH₃) m/z : 517 (M+NH₄)⁺.

15

5) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de N-4-hydroxy-3-nitro-(benzyloxycarbonyl)-daunorubicine (75a).

20

- Préparation : une solution de 74 (0,05 g-0,1 mmole) et de triéthylamine (28 µl, 0,2 mmole) dans 5 ml de dichlorométhane anhydre est ajoutée, à 20°C, sous argon, goutte à goutte, à une solution de disuccinimido-carbonate (0,05 g-0,2 mmole) dans 2 ml d'acétonitrile. Le mélange est agité durant 90 minutes. Après filtration et évaporation à sec, le succinimido-carbonate est obtenu quantitativement sous forme d'un précipité.

Au succinimidocarbonate brut précédemment préparé, est ajoutée à 20°C, sous argon, une solution de daunorubicine (0,03 g-0,06 mmole) et de triéthylamine (50 µl, 0,35 mmole) dans 3 ml de diméthylformamide. Après 15 minutes de réaction et évaporation du solvant, le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de N-4-hydroxy-3-nitro-(benzyloxycarbonyl)-daunorubicine est purifié par chromatographie sur gel de silice 60H (cyclohexane-acétone : 50/50-v/v) puis lavage par de l'eau (45,2 mg, 43 % global).

25

- Composé 75a : C₄₉H₅₂N₂O₂₄ ; M = 1052 ; amorphe ; [α]_D²⁰ = +217° (c 0,10, CHCl₃) ; RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,28 (d, J = 7 Hz, 3H), 1,97 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,69 (s, 1H éch/D₂O), 2,88 (d, J = 12 Hz, 1H), 2,93 (d, J = 19 Hz, 1H), 3,24 (d, J = 12 Hz, 1H), 3,24 (d, J = 19 Hz, 1H), 3,69 (s large, 1H), 3,78 (m, 1H éch/D₂O), 4,09 (s, 3H), 4,13 (d, J = 6 Hz, 2H), 4,23 (d, J = 7 Hz, 1H), 4,39 (t, J = 6 Hz, 1H), 4,72 (s, 1H éch/D₂O), 5,01 (s, 2H), 5,24 (dd, J = 10 et 4 Hz, 1H), 5,27 (m, 2H), 5,48 (dd, J = 10 et 3 Hz, 1H), 5,50 (m, 1H), 5,58 (d, J = 3 Hz, 1H), 5,87 (d, J = 4 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,48 (dd, J = 8 et 2 Hz, 1H), 7,76 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,79 (t, J = 8 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 8 Hz, 1H). SM (DIC/NH₃) m/z : 813 (M-239)⁺, 672 (M-380)⁺.

30

35

6) α -D-galactopyranoside de N-4-hydroxy-3-nitro-(benzyloxycarbonyl)-daunorubicine (75b).

40

- Préparation : une solution de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de N-4-hydroxy-3-nitro-(benzyloxycarbonyl)-daunorubicine (17 mg, 0,016 mmole) dans 2 ml de méthanolat de sodium 0,1 N est agitée et maintenue à 0°C pendant 30 minutes. Le milieu est neutralisé par addition de résine Amberlite IRC 120 H⁺, puis filtré. Le filtrat, évaporé à sec, fournit l' α -D-galactopyranoside de N-4-hydroxy-3-nitro-(benzyloxycarbonyl)-daunorubicine (14 mg-98 %).

45

- Composé 75b : C₄₁H₄₄N₂O₂₀ ; M = 884 ; amorphe ; [α]_D²⁰ = +246° (c 0,10, EtOH) ; RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,22 (d, J = 7 Hz, 3H), 1,95 (m, 2H), 2,28 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,81 (d, J = 19 Hz, 1H), 3,01 (d, J = 19 Hz, 1H), 4,04 (s, 3H), 5,38 (m, 1H), 5,82 (m, 1H), 7,50-7,70 (m, 4H), 7,90 (m, 2H). SM (FAB, matrice : thioglycérol) m/z : 885 (M+H)⁺.

50

EXEMPLE 17 : Synthèse du β -D-glucuronide de N-[4-hydroxy-3-chloro-(benzyloxycarbonyl)]-doxorubicine (78b).

1) 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de 4-hydroxy-3-chlorobenzaldéhyde (76).

55

- Préparation : à une solution de 4-hydroxy-3-chlorobenzaldéhyde (2 g ; 12,8 mmoles) et de bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl- α -D-méthylglucuronyle (3,4 g ; 8,5 mmoles) dans l'acétonitrile anhydre (150 ml), on ajoute de l'oxyde d'argent (10 g). Le milieu réactionnel est agité 4 heures à 20°C puis filtré sur célite et évaporé à sec. Après chromatographie sur gel de silice 60H (cyclohexane-acétone : 80/20 v/v) du résidu, on obtient le

2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de 4-hydroxy-3-chlorobenzaldéhyde (76) (1,6 g ; 40 %).

- Composé 76 : $C_{20}H_{22}ClO_{11}$; $M = 472,5$; $F = 125^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{20} = -57^{\circ}$ (c 0,5, $CHCl_3$) ; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3030, 2975, 2875, 1760, 1680, 1595, 1375, 1235, 1040 ; RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,09 (3H, s), 2,11 (3H, s), 2,20 (3H, s), 3,73 (3H, s), 4,28 (1H, d, $J = 9$ Hz), 5,25 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5,32-5,42 (3H, m), 7,30 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7,77 (1H, dd, $J = 8$ et 2 Hz), 7,93 (1H, d, $J = 2$ Hz), 9,90 (1H, s). SM (DIC/ NH_3) m/z : 490/492 ($M+NH_4$) $^+$ 352, 317.

2) 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de (4-hydroxyméthyl-2-chloro)-phényle (77).

- Préparation : une solution de 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de 4-hydroxy-3-chlorobenzaldéhyde (76) (1,56 g ; 3,3 mmoles) dans un mélange de chloroforme (35 ml) et d'isopropanol (7,5 ml) est additionnée à $0^{\circ}C$ de silice (3 g) puis de borohydrure de sodium (0,3 g, 7,8 mmoles). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le milieu est filtré, dilué par CH_2Cl_2 (30 ml), lavé à l'eau (3x30 ml), séché sur Na_2SO_4 et évaporé pour fournir le 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de (4-hydroxyméthyl-2-chloro)-phényle (1,00 g ; 64 %).

- Composé 77 : $C_{20}H_{23}ClO_{11}$; $M = 474,5$; $F = 138-140^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{20} = -95^{\circ}$ (c 0,1, $CHCl_3$) ; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3510, 2955, 1765, 1740, 1500, 1375, 1235, 1100, 1050, 900, 620, 775 ; RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 2,06 (3H, s), 2,09 (3H, s), 2,12 (3H, s), 3,74 (3H, s), 4,15 (1H, d, $J = 8$ Hz), 4,63 (2H, s), 5,04 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5,35 (3H, m), 7,20 (2H, m), 7,38 (1H, d, $J = 1,5$ Hz). SM (DIC/ NH_3) m/z : 492/494 ($M+NH_4$) $^+$, 317.

3) 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de N-(4-hydroxy-3-chloro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicine (78a).

- Préparation : une solution de 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de (4-hydroxyméthyl-2-chloro)-phényle (77) (1,00 g ; 2 mmoles) et de triéthylamine (300 μ l ; 2,1 mmoles) dans 80 ml de dichlorométhane anhydre est ajoutée goutte à goutte, à $20^{\circ}C$ et sous argon, à une solution de disuccinimidocarbonate (1,08 g ; 4,2 mmoles) dans 50 ml d'acétonitrile. Le mélange est agité pendant 90 minutes puis filtré et évaporé à sec pour fournir quantitativement le succinimido-carbonate (1,3 g), utilisé sans purification pour la condensation avec la doxorubicine.

Au succinimidocarbonate brut précédemment préparé, on ajoute à $20^{\circ}C$, sous argon, une solution de doxorubicine (0,882 g ; 1,6 mmoles) et de triéthylamine (230 μ l ; 1,6 mmoles) dans 40 ml de diméthylformamide. Après 2 heures de réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu fournit, après chromatographie sur colonne de gel de silice 60H (dichlorométhane-méthanol, 95/5 v/v), le 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de N-(4-hydroxy-3-chloro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicine (78a) (0,691 g ; 41 %).

- Composé 78a : $C_{46}H_{50}ClNO_{23}$; $M = 1043,5$; amorphe ; $[\alpha]_D^{20} = +260^{\circ}$ (c 0,01, CH_3OH) ; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3430, 2960, 2950, 1725, 1580, 1460, 1380, 1290, 1235, 1125, 1070, 1040, 755. RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 1,30 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 1,85 (2H, m), 2,02 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,09 (3H, s), 2,17 (1H, dd, $J = 15$ et 3,5 Hz), 2,35 (1H, dd, $J = 15$ et 1 Hz), 2,97 (1H, d, $J = 19$ Hz), 3,27 (1H, d, $J = 19$ Hz), 3,67 (1H, m), 3,77 (3H, s), 3,86 (1H, m), 4,08 (3H, s), 4,15 (2H, m), 4,75 (2H, s), 4,97 (2H, s), 5,02 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5,18 (3H, m), 5,50 (1H, dd, $J = 3,5$ et 1 Hz), 7,18 (2H, m), 7,30 (1H, d, $J = 1$ Hz), 7,38 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7,79 (1H, t, $J = 8$ Hz), 8,03 (1H, d, $J = 8$ Hz), 13,15 (1H, s, éch. D_2O), 13,85 (1H, s, éch. D_2O).

4) β -D-glucuronide de N-(4-hydroxy-3-chloro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicine (78b).

- Préparation : une solution de 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de N-(4-hydroxy-3-chloro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicine (78a) (0,280 g ; 0,27 mmoles) dans 60 ml de méthanolat de sodium 0,05 N est agitée à $0^{\circ}C$ pendant 45 min. Après neutralisation par addition de résine Amberlite IRC 120H $^+$, le milieu est filtré puis évaporé à sec. Le β -D-méthylglucuronide de N-(4-hydroxy-3-chloro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicine ainsi obtenu (240 mg) est utilisé sans purification pour la déprotection du groupement carboxyle.

Le β -D-méthylglucuronide de N-(4-hydroxy-3-chlorobenzyloxycarbonyl)-doxorubicine brut précédemment préparé est mis en solution dans 48 ml de tampon phosphate (pH = 8), additionné de 1,2 ml de solution d'esterase de foie de porc (Sigma, réf. E-3128) et de 24 ml d'acétone puis maintenu 4 heures à $37^{\circ}C$. Après évaporation à sec et chromatographie du résidu sur colonne de gel de silice 60H (acétonitrile-eau ; 95/5 v/v), on obtient le β -D-glucuronide de N-(4-hydroxy-3-chloro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicine (78b) (0,049 g ; 20 %).

- Composé 78b : $C_{41}H_{42}ClNO_{20}$; $M = 903,5$; amorphe ; $[\alpha]_D^{20} = +140^{\circ}$ (c 0,01, CH_3OH) ; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3400, 2950, 1580, 1510, 1470, 1415, 1240, 1215, 1100, 830, 760 ; RMN 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm : 1,11 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 1,90 (2H, m), 2,15 (2H, m), 3,98 (3H, s), 4,54 (2H, s), 4,87 (2H, s), 4,94 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5,20 (1H, dd, $J = 3,5$ et 1 Hz), 7,18 (2H, m), 7,36 (1H, d, $J = 1$ Hz), 7,70 (2H, m), 7,94 (1H, d, $J = 8$ Hz). SM

(FAB, matrice : alcool nitrobenzylique) m/z : 904/906 (M+H) ⁺.

COMPTE RENDU PHARMACOLOGIQUE CONCERNANT DES PRODROGUES SELON L'INVENTION.

5 TEST PHARMACOLOGIQUE :

Exemple A :

- . Les essais biologiques et biochimiques ont consisté en :
- 10 - une évaluation de la cytotoxicité de la prodrogue glycosylée,
 - une étude de la clivabilité du glycoside par l'enzyme correspondante,
 - une détermination *in vitro* de la cinétique de disparition du glycoside et de la formation des deux produits (anthracycline + bras auto-immolable et anthracycline) résultant d'abord de la coupure du sucre sur le phénol glycosylé, et ensuite de la coupure du bras autoimmolable (figures 1, 2, 3 et 4).
- 15 I. demi-vie : Les figures 1, 2, 3, 4 et 5 illustrent les résultats obtenus avec les dérivés 48b (figure 1), 60 (figure 2), 54c (figures 3 et 4) et 70c (figure 5). Ces figures comportent en abscisse le temps et en ordonnées, l'aire relative et permettent d'évaluer les concentrations de prodrogue et d'anthracycline en fonction du temps. Il faut noter que suivant le type de bras auto-immolable, la vitesse d'apparition de la daunorubicine est variable.
- . Résultats obtenus avec le dérivé 48b :
- 20 Celui-ci est incubé avec l' α -galactosidase (d'origine placentaire humaine) et 0,075 M de N-acétyl galactosamine à 37°C et pH 5 (tampon phosphate 0,02 M). Les résultats sont déterminés par HPLC (daunorubicine : t_r = 8,5 min ; 48b : t_r = 11,5 min ; 48b déglycosidé : t_r = 16,7 min), le 48b est hydrolysé avec une demi-vie de 1 h.
- A pH 5, le composé DNM-bras auto-immolable (produit déglycosidé) disparaît avec une demi-vie de 45 h, 25 celle-ci est inférieure à 16 h pour le même produit à pH 7,3 et la daunomycine apparaît dans le milieu.
- Le produit est stable dans le plasma.
- La figure 1 illustre les résultats obtenus avec le dérivé 48b.
- Cette figure 1 représente les concentrations en fonction du temps de la daunorubicine (1), du dérivé 48b (2) (prodrogue d'anthracycline conforme à l'invention) et de l'intermédiaire daunorubicine + bras auto-immolable (dérivé déglycosidé) (3).
- 30 . Résultats obtenus avec le dérivé 60 (figure 2). Celui-ci est incubé avec de l' α -galactosidase (grains de café vert, 0,04 U/ml) à 37°C et pH 6,8 (tampon phosphate 0,02 M).
- Ces résultats sont déterminés par HPLC (daunorubicine : t_r = 8,5 min ; 60 : t_r = 11,0 min) ; la concentration en dérivé 60 est de 660 μ g/ml.
- 35 A pH 6,8, le dérivé 60 déglycosidé n'est pas détecté, en raison de sa vitesse élevée de disparition.
- . Résultats obtenus avec le dérivé 54c (figures 3 et 4).
- La figure 3 montre les résultats obtenus lorsque le dérivé 54c est incubé avec de la β -glucuronidase humaine recombinante concentrée à 37°C et pH 7,2. La concentration de 54c est de 530 μ g/ml. Les résultats ont été déterminés par HPLC (daunorubicine : t_r = 8,8 min ; 54c : t_r = 9,7 min ; 54c déglycosidé : t_r = 16,0 min).
- 40 La figure 4 montre les résultats obtenus en présence de β -glucuronidase diluée à 1/100 (autres conditions identiques à celles de la figure 3).
- A pH 7,2, le dérivé 54 déglycosidé a une durée de demi-vie de l'ordre de 5,3 h.
- . Résultats obtenus avec le dérivé 70c. La figure 5 montre les résultats obtenus lorsque la prodrogue 70c est incubée avec de la β -glucuronidase humaine (0,45 U/ml) à 37°C et à pH 7,2.
- 45 II. test de prolifération :
- A. Protocole opératoire (réduction MTT) :
- Des cellules tumorales L1210, à une densité de 5.10³/ml dans un milieu RPMI sont incubées dans des plaques de microtitration contenant 96 puits pendant 72 heures (37°C, 5 % CO₂, 95 % d'humidité relative) avec différentes prodrogues conformes à l'invention.
- 50 Les témoins consistent en des cellules tumorales exposées à un milieu de culture. Quatre puits sont préparés pour chaque concentration en anthracycline et pour le témoin. Après 65 heures, 50 μ l de MTT (2,5 mg/ml dans du PBS) sont ajoutés.
- Le MTT sera réduit en présence de cellules vivantes en un colorant formazan rouge insoluble. Après 7 à 24 heures d'incubation supplémentaire (dépendant des cellules utilisées), le surnageant est enlevé. Le colorant formazan est solubilisé par l'addition de 100 μ l de DMSO dans chaque puits, suivie d'une agitation douce.
- 55 L'extinction est mesurée pour chaque puits, à 492 nm (photomètre Multiscan 340 CC Fa. Flow).
- B. Résultats :
- Les résultats sont exprimés comme le rapport de l'extinction après incubation avec la prodrogue sur

l'extinction obtenue avec les témoins. Le coefficient de variation est inférieur à 15 %. Les prodrogues ont une cytotoxicité considérablement réduite par rapport à la doxorubicine.

	Produits testés	L1210 CI ₅₀ (µg/ml)
5	doxorubicine	0,02
	dérivé 6	> 1
	dérivé 7	> 1
10	dérivé 13	> 1
	dérivé 14	> 1
	dérivé 22	> 10
	dérivé 27c	> 1
	dérivé 48b	> 1
15	dérivé 48a	> 10

Les acétates 6, 13 et 48a sont hydrolysés *in vivo* respectivement en 7, 14 et 48b.

III. Comparaison de l'aptitude au clivage de prodrogues glycosylées conformes à l'invention avec des drogues glycosylées et influence de la structure du bras sur la vitesse de coupure du glycosyle et la vitesse d'élimination du bras auto-immolable :

On synthétise des prodrogues conformes à l'invention du type daunomycine-bras auto-immolable- β -glucuronides, doxorubicine-bras auto-immolable- β -glucuronides et doxorubicine-bras auto-immolable- α -galactosides conformément au procédé décrit ci-dessus.

On incube les substances à 37°C avec de la β -glucuronidase recombinante (ou de l' α -galactosidase de grains de café) (1 U/ml), à un pH de 7,2 à 6,8, et on détermine la cinétique de disparition du glycoside ainsi que la cinétique de formation de daunomycine et de doxorubicine à l'aide d'une HPLC à phase inverse. Le temps de coupure de 50 % du glycoside et le temps de transformation de 50 % du composé anthracycline-bras en anthracycline active sont indiqués dans le Tableau I ci-après, qui se lit en référence à la formule suivante :

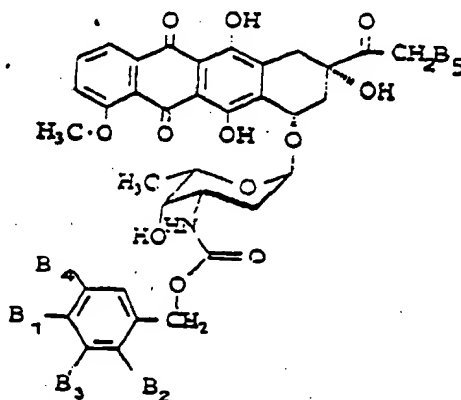


TABLEAU I

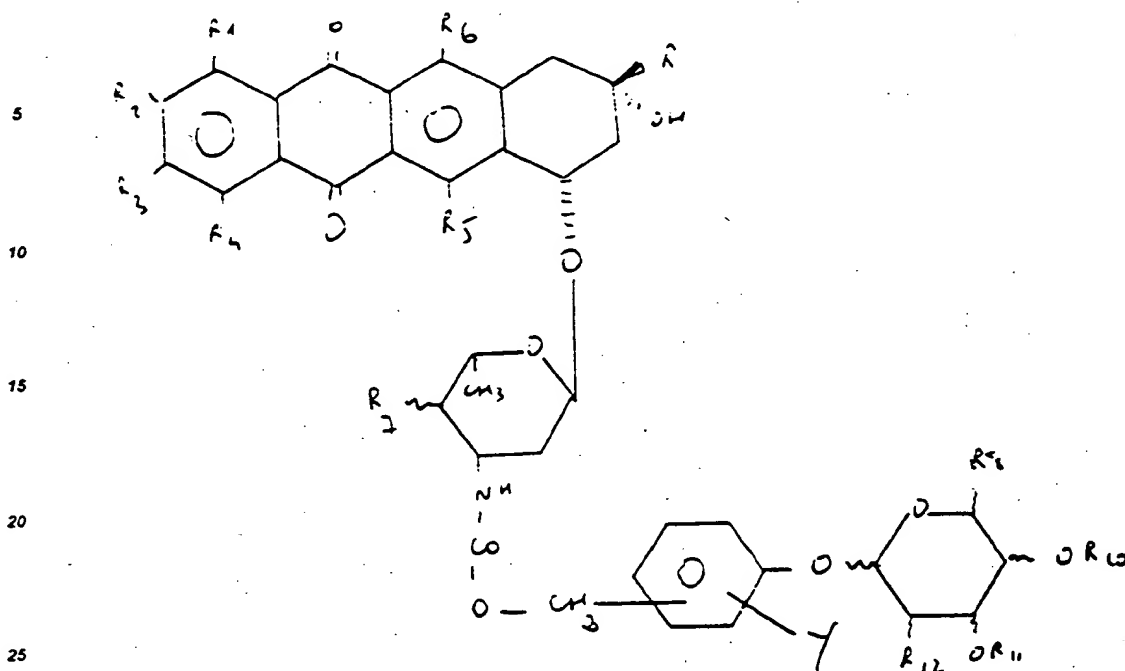
Substance	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	t _{1/2} clivage du gly- coside (h)	t _{1/2} bras (h)
B ₅ = H (daunomycine)						
1 (68c)	OCH ₃	β-Gluc	H	NO ₂	1,88	0,75
2 (54c)	H	β-Gluc	H	NO ₂	0,69	5,30
3 (82c)	H	β-Gluc	H	Cl	4,06	12,00
4 (64c)	β-Gluc	H	H	NO ₂	0,42	<0,08
5 (60)	α-Gal	H	H	Cl	0,02	<0,08
B ₅ = OH (doxorubicine)						
6 (70c)	H	β-Gluc	H	NO ₂	0,92	n.t.

Le β-glucuronide exempt de bras, servant de substance de comparaison, est clivé de 50 à 100 fois moins vite que les composés daunomycine-bras-glucuronides ou que les composés doxorubicine-bras-glucuronides. Ceci indique que la présence d'un bras auto-immolable adéquat pour le clivage du composé glucuronide-prodrogue est d'une importance décisive. De plus, les substituants présents sur le cycle aromatique de ce bras auto-immolable (hydroxybenzylcarbammates, par exemple) ont une influence sur la cinétique de coupure du dérivé glycosylé et sur la cinétique de décomposition du produit anthracycline + bras auto-immolable. On trouve un clivage plus rapide du glycosyle et une élimination automatique plus rapide du bras pour les prodrogues conformes à l'invention, dans lesquelles B₁ est un β-glucuronide et B₄ est un groupe NO₂ ou un atome de chlore. D'autres substituants permettent également d'obtenir les cinétiques souhaitées.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

Revendications

1°) Prodrogues d'anthracyclines, caractérisées en ce qu'elles répondent à la formule I ci-après :



dans laquelle,

R_1, R_2, R_3 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ;

R_4 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle ou un groupe méthoxy ;

R représente un groupe $\text{CO-CH}_2\text{-R''}$, dans lequel R'' est un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_6$, un groupe hydroxyle, un groupe alkoxy, un groupe O-acyle ou un groupe aryle ;

R_5 et R_6 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ;

R_7 représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ;

R_8 représente un groupe $\text{-CH}_2\text{-OR}_9$ ou un groupe COOR_9 avec

R_9 étant un alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_3$ ou un atome d'hydrogène ;

R_{10} et R_{11} représentent un atome d'hydrogène, un groupement acyle protecteur ou un groupe alkyle ;

R_{12} représente un groupe hydroxyle, un groupement amine, un groupement amide ou un groupement O-acyle protecteur ;

le -CH_2 benzylique est de préférence en position para ou ortho de l'oxygène glycosylé ;

Y représente un atome d'hydrogène, ou au moins un groupement électro-attracteur notamment choisi dans le groupe qui comprend le groupement NO_2 , un atome d'halogène, un groupement SO_2X , (avec $\text{X} = \text{-CH}_3, \text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_3, \text{NH}_2, \text{N-(alkyle}_{\text{C}_{1-4}})_2, \text{NH-(alkyle}_{\text{C}_{1-4}}), \text{-CN}$, acyle ou COC-alkyle , et/ou au moins un groupement électrodonneur choisi dans le groupe qui comprend les groupements de type O-alkyle, NHCO-alkyle , N(alkyl)CO-alkyle , S-alkyle, alkyle.

2°) Prodrogues selon la revendication 1, caractérisées en ce que lorsque Y représente un/des groupements électroattracteurs, ceux-ci sont de préférence en position ortho et/ou para de l'oxygène glycosylé et lorsque Y représente un/des groupements électrodonneurs, ceux-ci sont de préférence en position méta.

3°) Prodrogues selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisées en les composés préférés d formule I comprennent notamment les radicaux suivants :

R_1, R_2, R_3 sont des atomes d'hydrogène,

R_4 est un groupe méthoxy,

R_5 et R_6 sont des groupes hydroxyles,

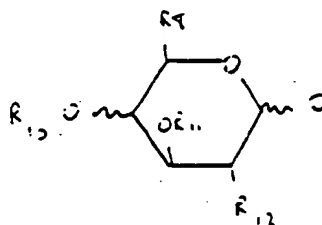
R est un groupe -CO-CH_3 ou un groupe $\text{-CO-CH}_2\text{OH}$,

R_7 est un atome d'hydrogène, ou un groupe hydroxyle,

R_8 est un groupe $\text{-CH}_2\text{-OAc}$, $\text{-CH}_2\text{OH}$, -COOMe , ou -COOH ,

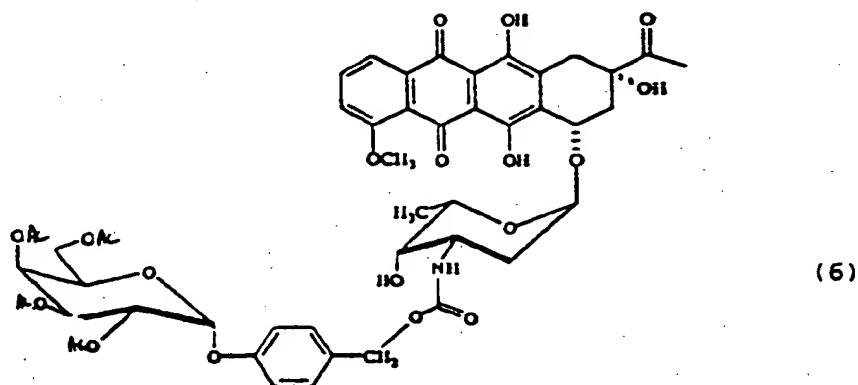
R_{10} et R_{11} , qui peuvent être identiques ou différents représentent un atome d'hydrogène ou un groupement Ac,

R_{12} représente un groupe hydroxyle ou un groupe OAc, lesquels radicaux R_8 , R_{10} , R_{11} et R_{12} ont de préférence les positions suivantes :

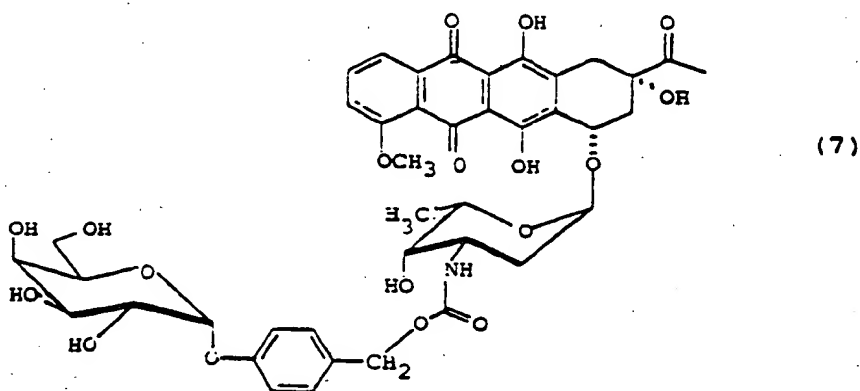


Y est un atome d'hydrogène, un groupe NO_2 ou un atome de chlore, en para ou en ortho de l'oxygène glycosylé ou un groupe OCH_3 en méta de l'oxygène glycosylé.

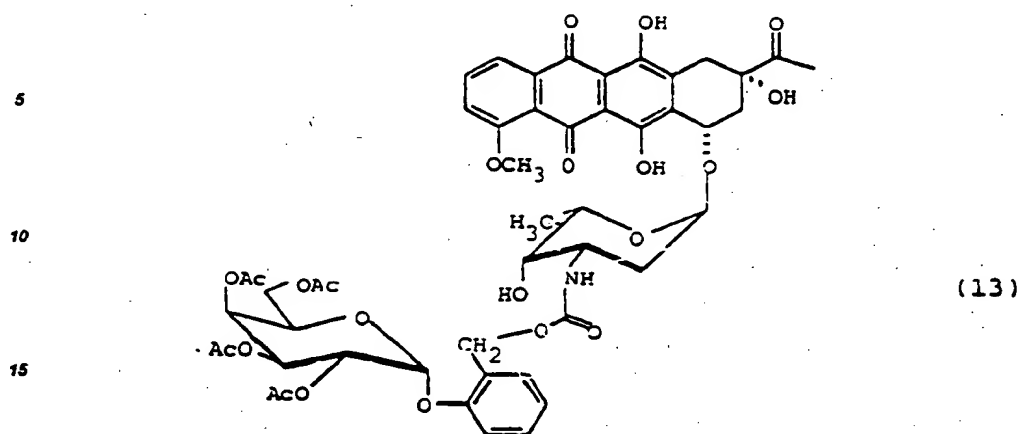
4°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 6 ci-après :



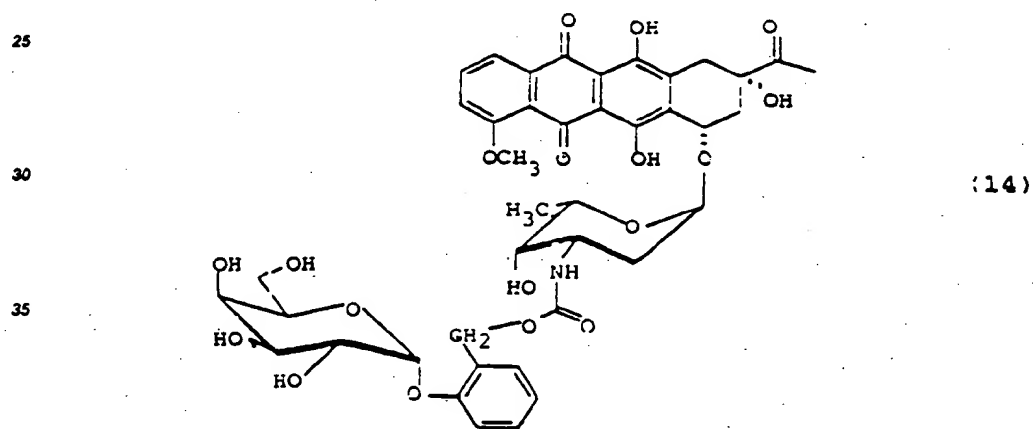
5°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 7 ci-après :



6°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 13 ci-après :



20 7°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 14 ci-après :

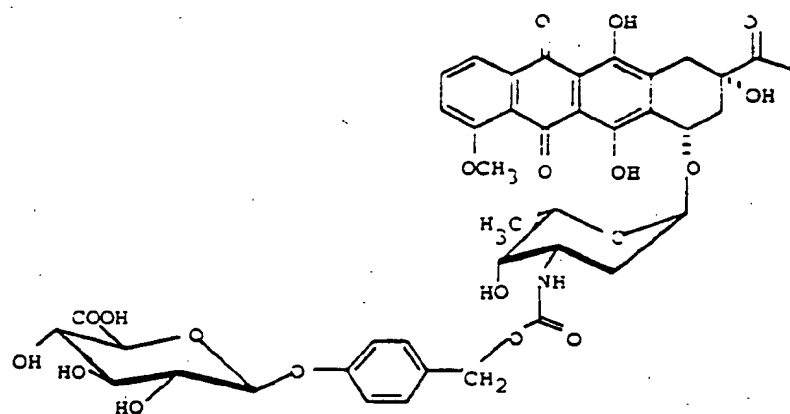


8°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 22 ci-après :

5

10

15



(22)

20

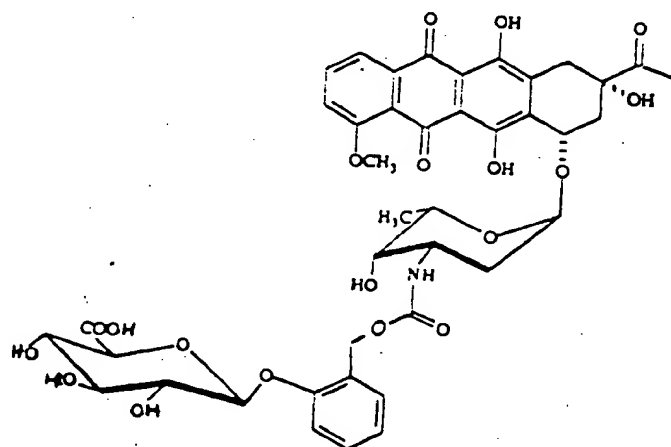
9°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 27c ci-après :

25

30

35

40



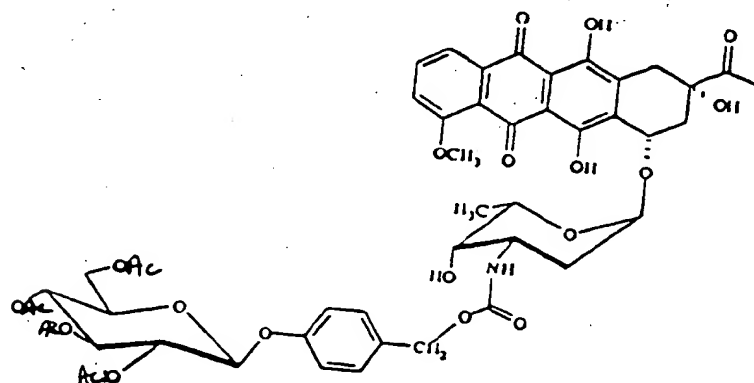
(27c)

10°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 36 ci-après :

45

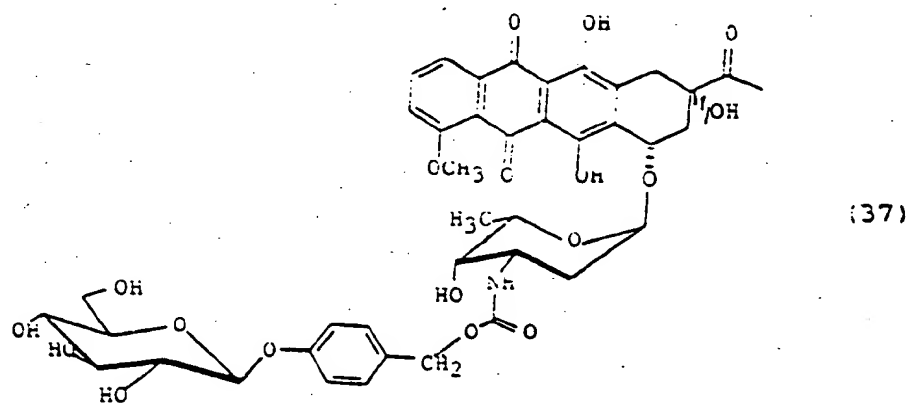
50

55

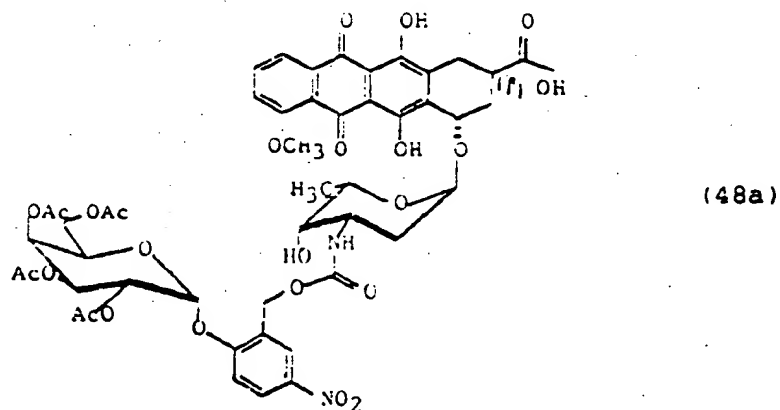


(36)

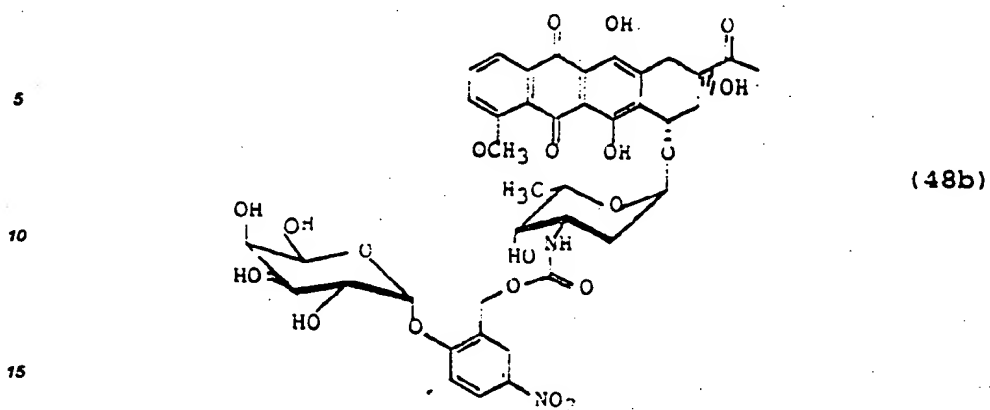
11°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 37 ci-après :



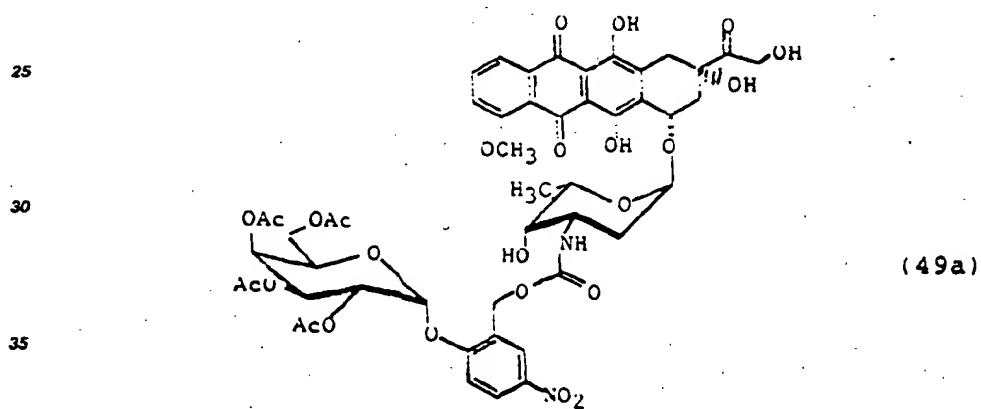
12°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 48a ci-après :



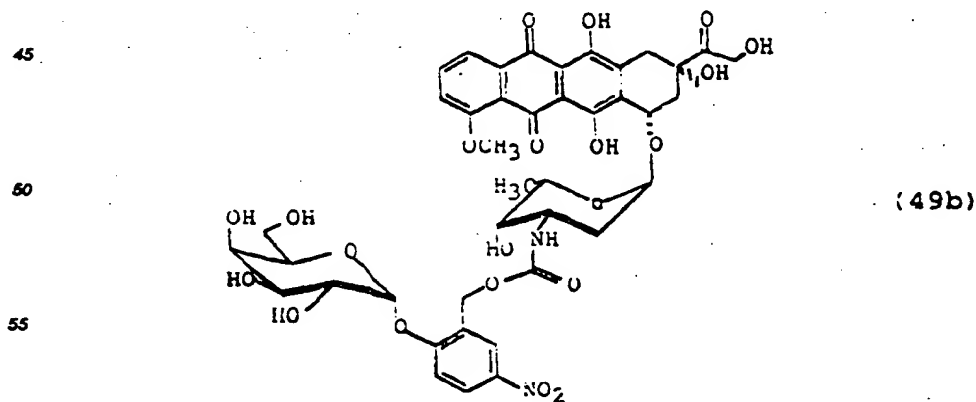
13°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 48b ci-après :



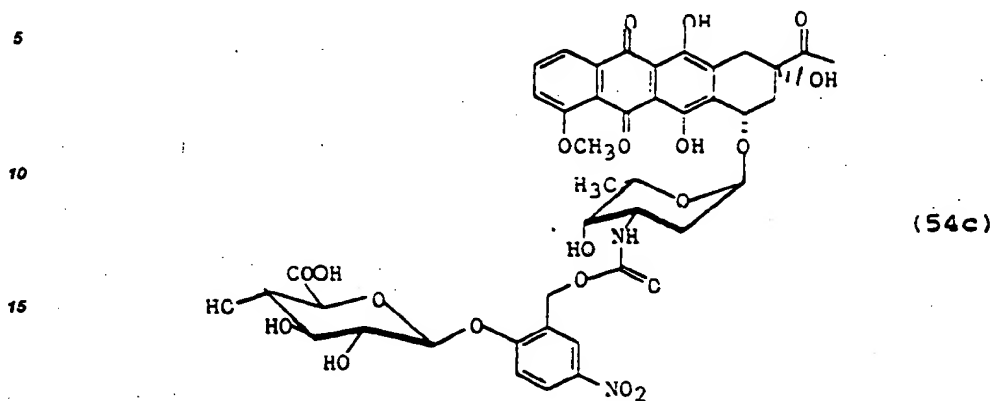
20 14°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 49a ci-après :



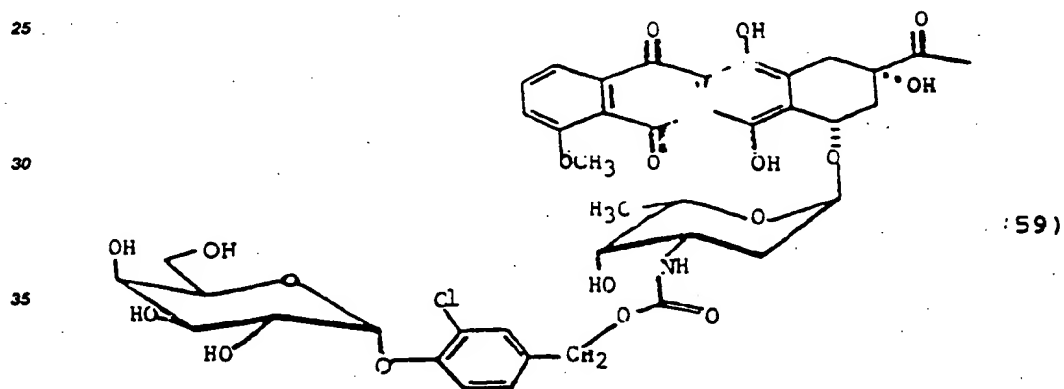
40 15°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 49b ci-après :



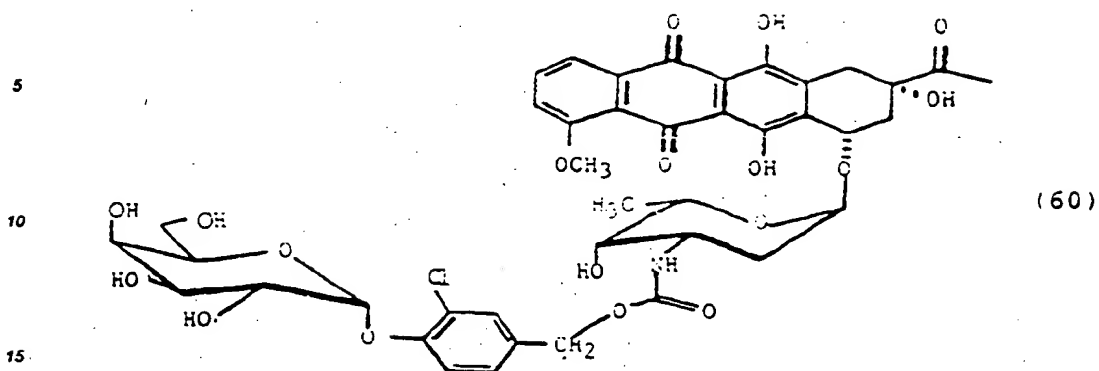
16°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 54c ci-après :



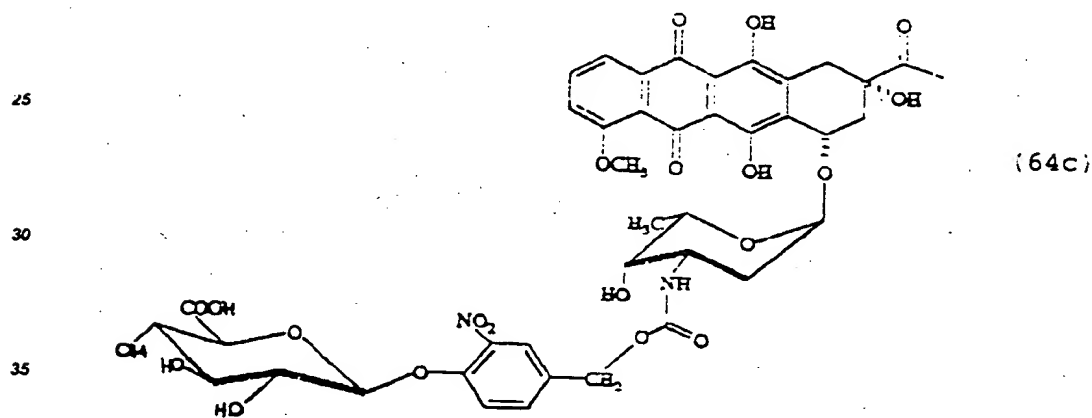
17°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 59 ci-après :



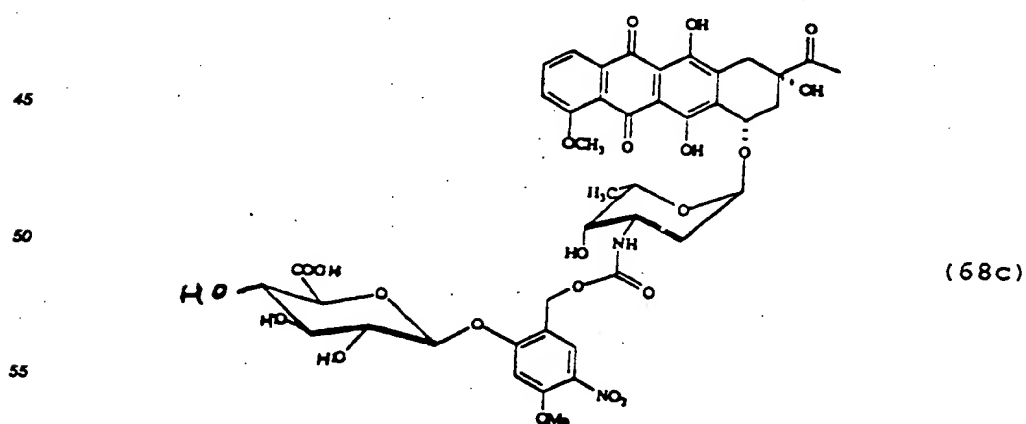
18°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 60 ci-après :



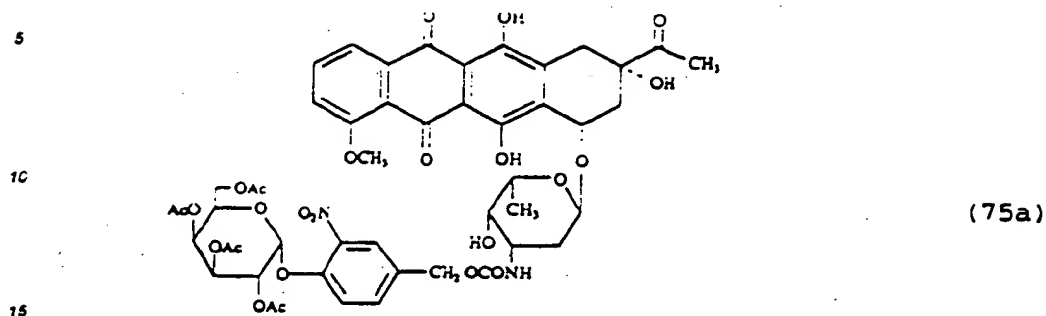
20 19°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'elle présente la formule 64c ci-après :



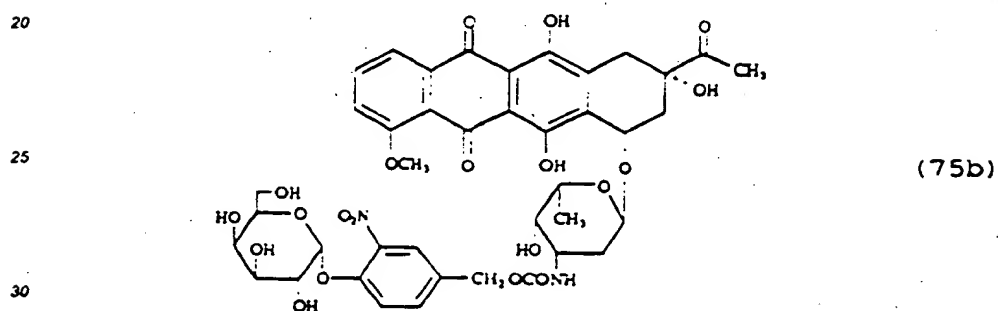
40 20°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 68c ci-après :



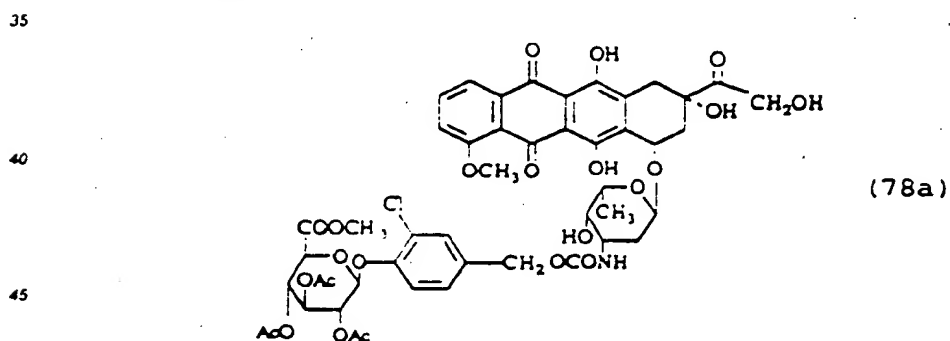
21°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 75a ci-après :



22°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 75b ci-après :

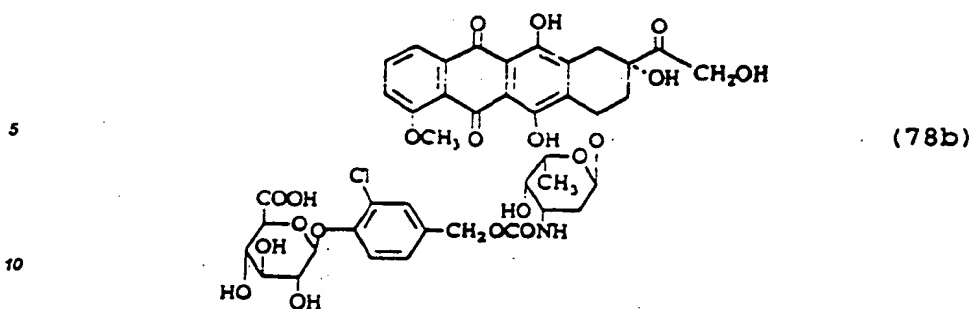


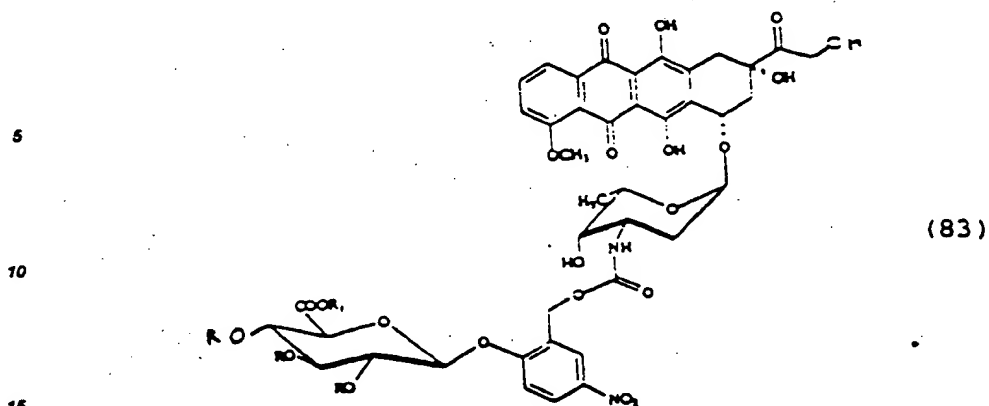
23°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 78a ci-après :



24°) Prodrogue selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente la formule 78b ci-après :

55





avec :

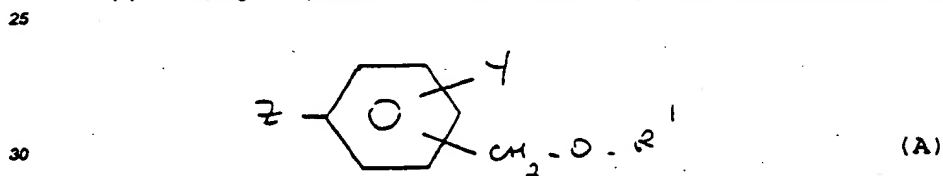
83a : R = Ac, R₁ = CH₃

20 83b : R = H, R₁ = CH₃

83c : R = R₁ = H

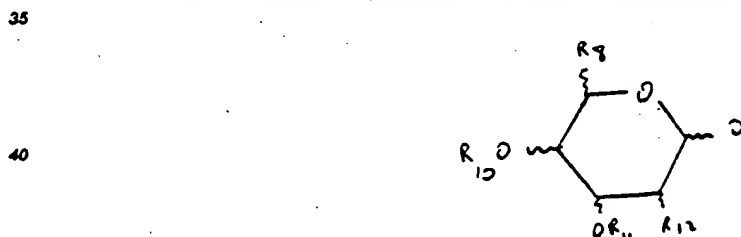
28*) Procédé de préparation d'un composé de formule I qui peut notamment être dégradé par une glycosidase, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) le couplage, en présence, éventuellement, d'un promoteur approprié, d'un dérivé de formule A :



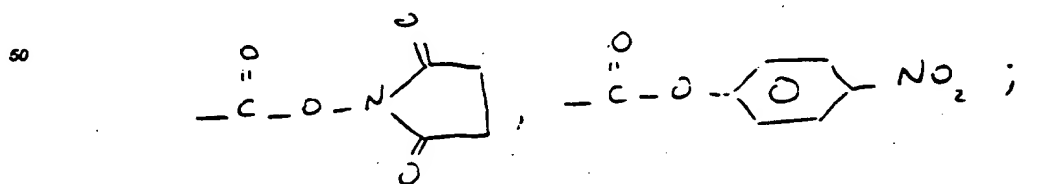
dans laquelle

Z représente un groupe hydroxyle, un groupe O-trialkylsilyle ou un groupe



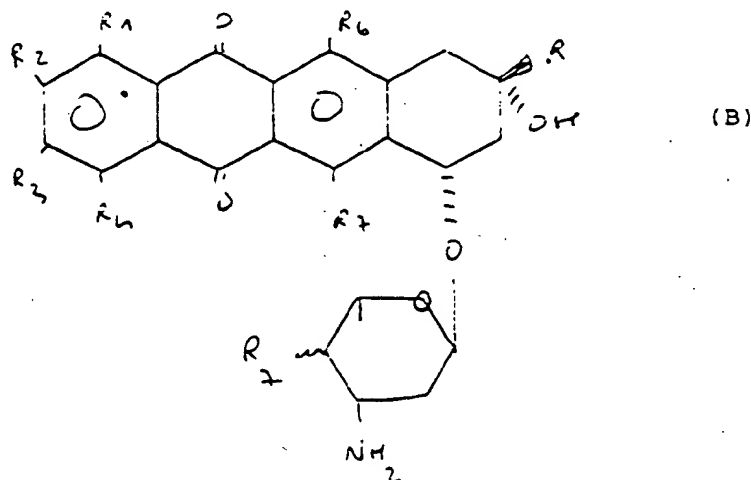
45 dans lequel R₉, R₁₀, R₁₁ et R₁₂ ont la même signification que ci-dessus ;

R' représente un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants :



le -CH₂ benzylque est de préférence en position para ou ortho de la fonction phénol, éventuellement modifiée (glycosylé ou silylée) ;

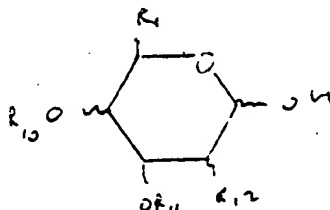
Y représente un atome d'hydrogène, ou au moins un groupement électro-attracteur notamment choisi dans le groupe qui comprend le groupement NO_2 , un atome d'halogène, un groupement SO_2X , (avec $\text{X} = -\text{CH}_3$, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$, NH_2 , $\text{N}-(\text{alkyle}_{1-4})_2$, NH-alkyle_{1-4}), $-\text{CN}$, acyle ou COC-alkyle , et/ou au moins un groupement électro-donneur choisi dans le groupe qui comprend les groupements de type O-alkyle, NH-CO-alkyle, N(alkyl)CO-alkyle, S-alkyle, alkyle avec une anthracycline de formule B



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 et R ont la même signification que ci-dessus.

(2) l'élimination des groupes protecteurs présents dans les composés obtenus, notamment par hydrolyse, transestérification ou saponification, et

(3) éventuellement, la condensation appropriée avec un ose de formule suivante :



dans le cas où Z représente un groupement hydroxyle ou un groupe O-trialkylsilyle,

pour donner une prodrogue d'anthracycline de formule I, dans laquelle tous les radicaux R_1 à R_{12} et R ont la même signification que précédemment.

29°) Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (1), le dérivé p-hydroxybenzyle glycosylé est obtenu par :

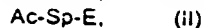
(a) fusion d'un crésol avec un ose ou un glucuronate de méthyle peracétylé.

(b) bromation benzylique du produit obtenu,

(c) solvolysé du dérivé bromé, et

(d) activation du groupe hydroxyle par un dérivé hydroxysuccinimidyle ou paranitrophénoxy-carbonylé.

30°) Produits comprenant une prodrogue d'anthracycline modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 27 et un conjugué enzyme-anticorps spécifique vis-à-vis d'une tumeur, de formule II

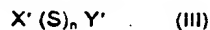


dans laquelle :

Ac est un anticorps ou l'un de ses fragments, qui présente une spécificité vis-à-vis d'un antigène associé à une tumeur, ou est une biomolécule qui a tendance à s'accumuler dans une tumeur, tel que l'EGF (facteur de croissance épidermique), l' α -TGF (facteur de croissance transformant α), le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), l'IGF I+II (facteur de croissance de l'insuline I+II) ou le FGF a+b (facteur de croissance fibroblastiques a+b).

E représente une glycosidase qui n'est pas immunogène ou présente une immunogénicité très faible, de préférence une glycosidase de mammifère, telle que l' α ou la β -glucosidase, l' α -galactosidase, l' α ou la β -mannosidase, l' α -fucosidase, la N-acétyl- α -galactosaminidase, la N-acétyl- β -N-acétyl- α -glucosaminidase ou la β -glucuronidase.

5 Sp (Bras) représente un groupe contenant un sulfure ou un disulfure de formule III ou IV



ou un bras polypeptidique, dans lequel

X' ou Y' représente -CO-R₁₃-(N-succinimido)- ou -C(=R₁₄)-CH₂-CH₂- avec

10 R₁₃ étant un groupement -CH₂-CH₂, 1,4-cyclohexylidène, 1,3 ou 1,4 phénylène ou méthoxycarbonyl ou chloro-1,4-phénylène

et R₁₄ étant un atome d'oxygène ou un groupe NH, et de plus,

Y' représente -C(=R₁₄)-CH₂-CH₂, lorsque R₁₄ a la signification précisée ci-dessus et

n représente 1 ou 2,

15 pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en thérapie cytotatique.

31°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-bromométhyl phényle de formule 2, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

32°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-formyl phényle de formule 3, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

20 33°) 2,3,4,6-Tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 4-hydroxyméthyl phényle de formule 4, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

34°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-bromométhyl phényle de formule 9, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

25 35°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-formyl phényle de formule 10, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

36°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-hydroxyméthyl phényle de formule 11, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

37°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-bromométhyl phényle) uronate de méthyle de formule 16, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

30 38°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-formyl-phényle) uronate de méthyle de formule 17, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 26.

39°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-hydroxyméthyl phényle) uronate de méthyle de formule 18, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

35 40°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-bromométhyl phényle) uronate de méthyle de formule 23, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

41°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-hydroxyméthyl phényle) uronate de méthyle de formule 24, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

42°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-formyl phényle) uronate de méthyle de formule 25, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

40 43°) 2-tertiobutylidiméthylsilyloxy-benzaldéhyde de formule 28, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

44°) alcool 2-tertiobutylidiméthylsilyloxybenzylique de formule 29, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

45 45°) N-[2-hydroxy-benzyloxycarbonyl] daunorubicine de formule 32, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

46°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-formyl phényle de formule 33, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

47°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-hydroxyméthyl phényle de formule 34, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

50 48°) N-[4-hydroxy-benzyloxycarbonyl] daunorubicine de formule 38, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

49°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-méthyl 4-nitro phényle de formule 42, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

55 50°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-bromométhyl 4-nitro phényle de formule 43, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

51°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-dibromométhyl 4-nitro phényle de formule 44, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

52°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-formyl 4-nitro phényle de formule 45, produit in-

intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

53°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -galactopyranoside de (2-hydroxyméthyl-4-nitro) phényle de formule 46, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

54°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-formyl 4-nitro phényle) uronate de méthyle de formule 51, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

55°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 2-hydroxyméthyl 4-nitro-phényl)uronate de méthyle de formule 52, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

56°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-chloro-4-méthyl phényle de formule 55, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

57°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-chloro-4-bromométhyl phényle de formule 56, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

58°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de 2-chloro-4-hydroxyméthyl phényle de formule 57, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

59°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-formyl 2-nitro-phényle) uronate de méthyle de formule 61, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

60°) (2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de 4-hydroxyméthyl-2-nitro phényle) uronate de méthyle de formule 62, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

61°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-bromométhyl 2-nitro)-phényle de formule 73, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

62°) 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranoside de (4-hydroxyméthyl 2-nitro)-phényle de formule 74, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

63°) 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de 4-hydroxy-3-chlorobenzaldéhyde de formule 76, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

64°) 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-méthylglucuronide de (4-hydroxy-méthyl-2-chloro)-phényle de formule 77, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

65°) Carbonate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle et de 4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-benzyle de formule 5, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

66°) Carbonate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle et de 2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-benzyle de formule 12, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

67°) Carbonate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle et de 4-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyle de formule 19, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

68°) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyle de formule 26, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

69°) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-(tertiobutylidiméthylsilyloxy)-benzyle de formule 30, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

70°) Carbonate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle et de 4-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-benzyle de formule 35, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

71°) Carbonate de 2,5-dioxypyrrolidin-1-yle et de 4-diméthylhexyl-silyloxybenzyle de formule 40, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

72°) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)-5-nitrobenzyle de formule 47, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

73°) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitro-benzyle de formule 53, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

74°) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 4-méthoxy-5-nitro-2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-benzyle de formule 67, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

75°) Carbonate de 4-nitro-phényle et de 4-(2,3,4-tri-O-acétyl- β -glucopyranosyl) uronate de méthyle-5-nitro-benzyle de formule 69, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

76°) Carbonate de 4-chlorophényle et de 2-((2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl) uronate de méthyle)-5-nitrobenzyle de formule 81, produit intermédiaire du procédé selon la revendication 28.

77°) Application des prodrogues selon l'une quelconque des revendications 1 à 27, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des maladies dans lesquelles des macrophages, granulocytes, thrombocytes ou cellules tumorales, activés, sont impliqués.

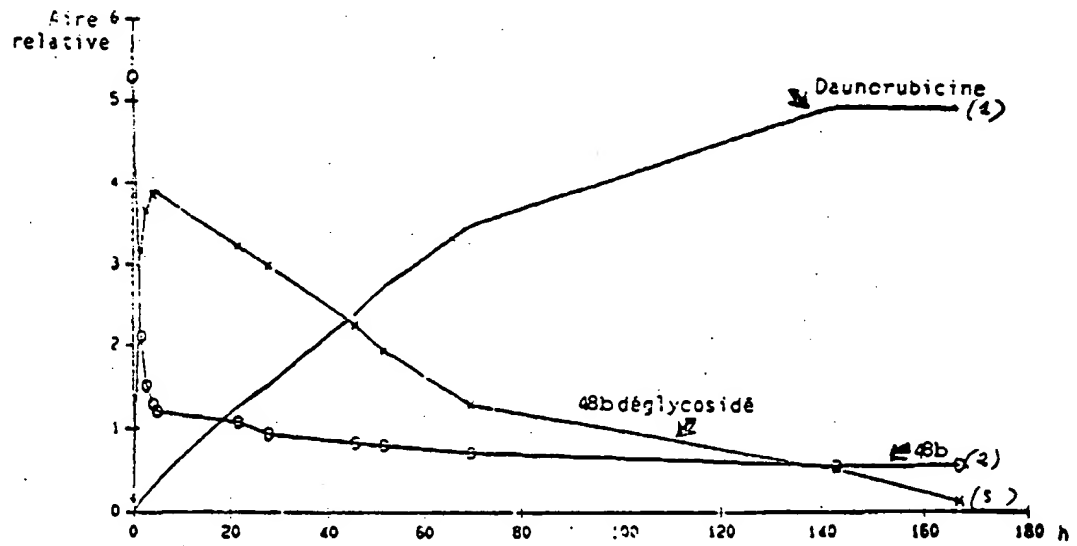


FIGURE 1

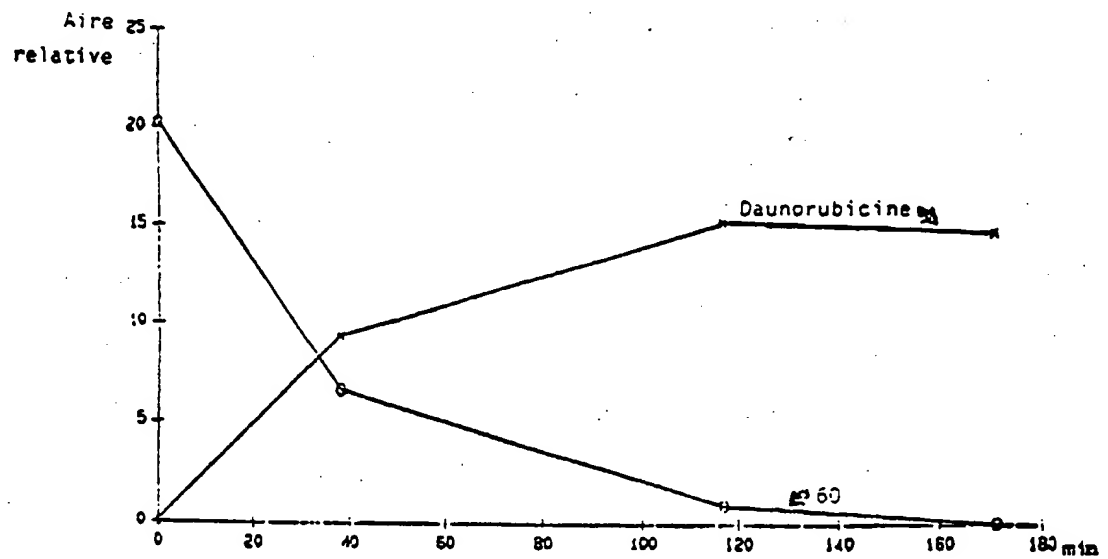


FIGURE 2

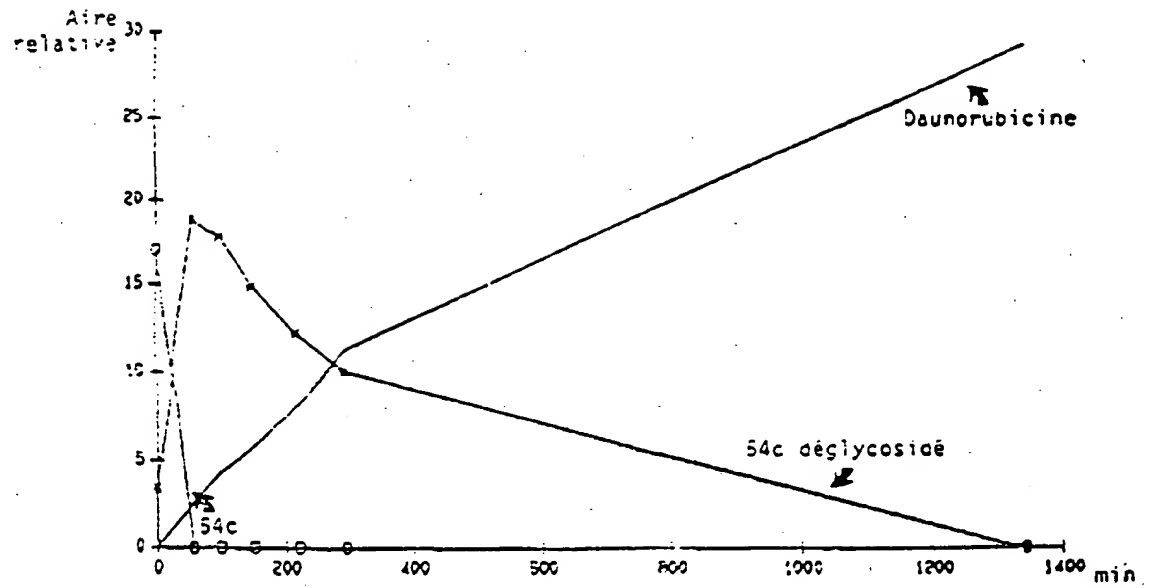


FIGURE 3

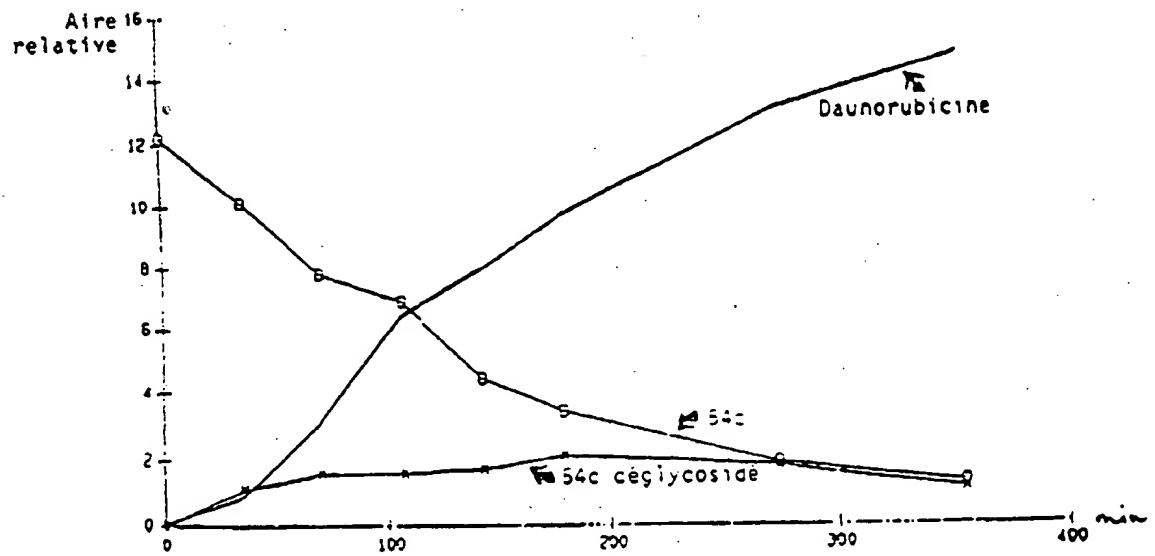


FIGURE 4

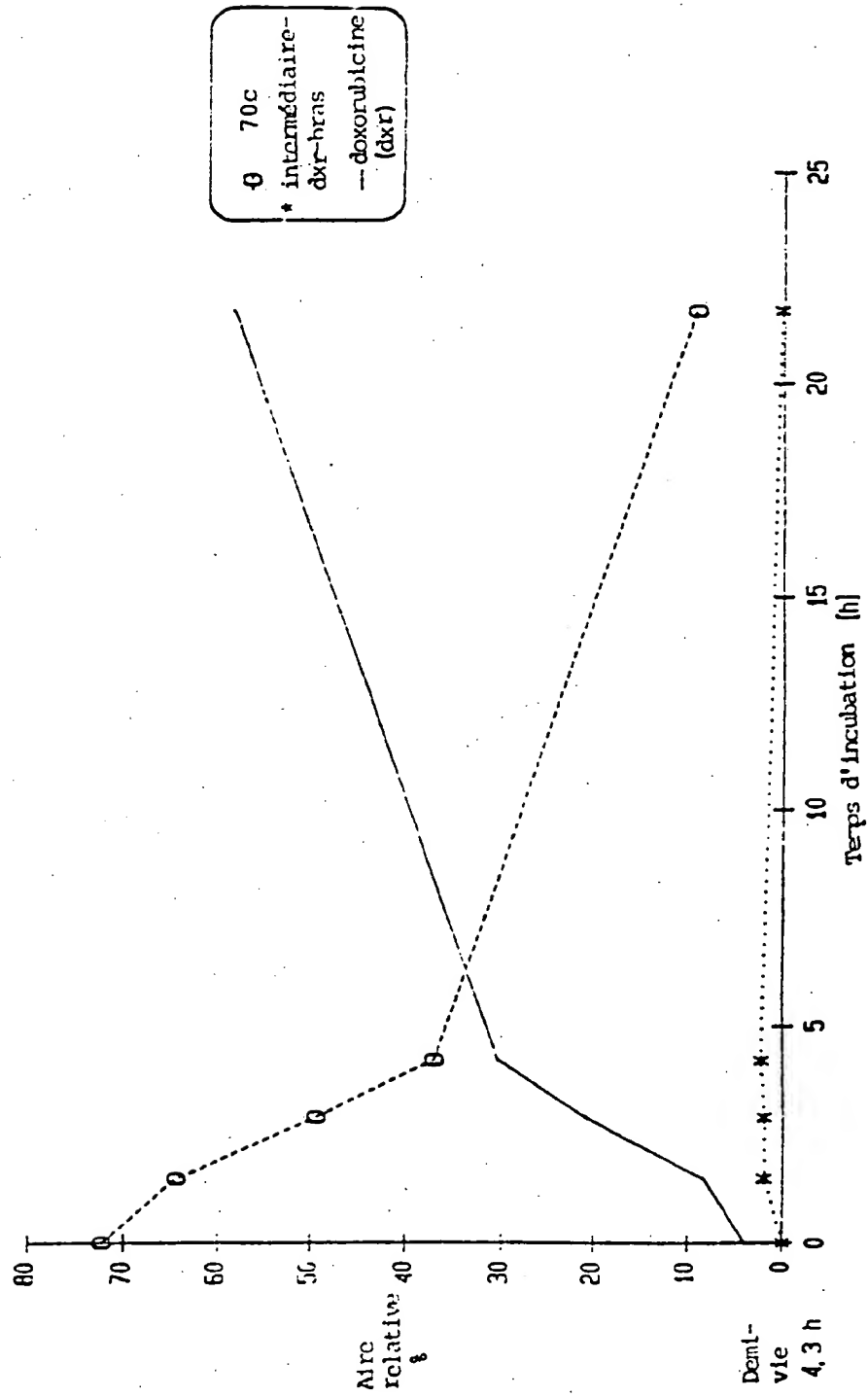


FIGURE 5

Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 92 40 1218

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CLS)
A	EP-A-0 410 366 (BEHRINGWERKE) " le document en entier "	1	C07H15/252 C07F7/18 C07H15/203 A61K31/70 C07H15/26
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CLS)
			C07H C07F A61K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 06 JUILLET 1992	Examinateur RINKEL L. J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM LYO (04.87) (P0402)